

TESIS DOCTORAL

***Estudio de polimorfismos y  
acortamiento telomérico en  
pacientes con cataratas***



**Vanesa Rivero Gutiérrez**

**2015**

Universidad de Salamanca

Instituto Universitario de Biología  
Molecular y Celular del Cáncer



# **TESIS DOCTORAL**

## ***Estudio de polimorfismos y acortamiento telomérico en pacientes con cataratas***

**Vanesa Rivero Gutiérrez**

**2015**

**Universidad de Salamanca**

**Instituto Universitario de Biología  
Molecular y Celular del Cáncer**

**Dr. D. Rogelio González Sarmiento. Catedrático de  
Medicina de la Universidad de Salamanca.**

**Dra. Dña. Lourdes de Juan Marcos. Profesora asociada de  
Medicina de la Universidad de Salamanca**

**Dr. D. Fernando Cruz González. Profesor asociado de  
Medicina de la Universidad de Salamanca**





**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**

El Dr. D. Rogelio González Sarmiento, Catedrático del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca y coordinador del programa de doctorado Biociencias: Biología y Clínica del Cáncer y Medicina Traslacional,

CERTIFICA:

Que el trabajo “Estudio de polimorfismos y acortamiento telomérico en pacientes con cataratas” que presenta la Licenciada en Medicina Dña. Vanesa Rivero Gutiérrez, ha sido realizado bajo mi dirección en la Unidad de Medicina Molecular del Departamento de Medicina y, reúne, a mi juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentado ante el comité evaluador correspondiente y optar al título de “Doctora en Medicina” por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, expide el presente certificado en Salamanca a de Julio de 2015.

FDO. Dr. D. Rogelio González Sarmiento



# AGRADECIMIENTOS

---





*A mi familia*



*Me gustaría mostrar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de una forma u otra han hecho posible la realización de este trabajo.*

*En primer lugar, dar las gracias a mis directores, Rogelio González Sarmiento, por la confianza depositada en mí desde el primer día, por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio. GRACIAS también a Lourdes de Juan Marcos y Fernando Cruz González, por todo el trabajo realizado, por su ayuda infinita y su constancia para hacer más fácil la continuación de este proyecto.*

*A Jessica Pérez, Javier Fernández y Ricardo Usategui, por cada minuto de vuestro tiempo invertido en que mi ignorancia se volviera admiración, por cada palabra de apoyo, risa, gesto que hizo que el trabajo de la investigación fuera sin duda un feliz recuerdo.*

*Dar las gracias a Nieves Mateos por su efectividad y su capacidad para encontrar solución a los problemas.*

*A todos los compañeros de la Unidad de Medicina Molecular de la Facultad de Medicina con los que he tenido el gusto de coincidir durante mis días de investigación por hacer del trabajo, un pequeño placer.*

*A todos los pacientes que han participado en este proyecto y a todas aquellas personas que entienden y valoran la importancia del trabajo que se realiza en el laboratorio.*

*Al servicio de Oftalmología y Medicina Interna médicos, en especial a la Dra. Ana Sánchez Jara, Dra. Gloria López y Dr. Miguel Marcos, y enfermeras tanto de la consulta como del quirófano por ayudarme a recopilar muestras de todos los pacientes.*

*A todos mis compañeros médicos que se han embarcado en este duro mundo de la investigación, para que no olviden que pese a la dificultad del camino por ese tiempo extra que supone en nuestra apretada vida, tiene al final una gratificante recompensa por el logro conseguido y el trabajo bien hecho.*

*Dar las gracias a mis amigos, esos que siempre están en los buenos y en los malos momentos, por las sonrisas y las lágrimas compartidas, por todo el camino recorrido juntos y por las nuevas experiencias que nos quedan por vivir.*

*A ti, que has conseguido que este último y complicado tramo sea más feliz, más sencillo, con tu alegría y bajo tu inmejorable compañía.*

*Y por último, a mis padres y hermano por vuestro apoyo, vuestros consejos, por no fallarme nunca, porque todo lo que diga nunca podrá expresar todo el agradecimiento que siento.*

*A TODOS, GRACIAS.*

# DIFUSIÓN DE RESULTADOS

---



- European Conference of Human Genetics, Glasgow (June 9<sup>th</sup> 2015).  
Poster presentation: *"Association between telomere length and telomerase polymorphisms in young adults with cataract"*.





## ABREVIATURAS

---



A: adenina

ADN: ácido desoxirribonucleico

ANOVA: análisis de la varianza

ARN: ácido ribonucleico

AREDS: the age related eye disease study

ATP: adenosine trifosfato

AV: agudeza visual

BER: reparación por escisión de bases

C: citosina

C: cortical

°C: grados centígrados

Ca<sup>2+</sup>: cálcio

CIAA: cloroformo alcohol isoamílico

Ct: ciclo umbral en la PCR a tiempo real

ddH<sub>2</sub>O: agua bidestilada

DE: desviación estándar

DKC1: dyskerin 1

DM: diabetes mellitus

DO: densidad óptica

DSBR: reparación de rotura de doble cadena

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

ETDRS: early treatment diabetic retinopathy study

grs: gramos

G: guanina

HCl: ácido clorhídrico

HTA: hipertensión arterial

IC: índice de confianza

K<sup>+</sup>: potasio

kb: kilobase

KCl: cloruro potásico

LIO: lente intraocular

LOCS: lens opacities classification system

LTL: longitud telómero del leucocito

M: mol

mM: milimol

MgCl: cloruro magnésico

ml: mililitros

mm.: milímetros

MMR: mismatch repair

n: tamaño muestral

Na<sup>+</sup>: sodio

NER: reparación por escisión de nucleótidos

ng: nanogramo

nm: nanómetros

NO/NC: nuclear

OD: odds ratio

P: posterior

PAS: peryodic acid schiff

PAX-6: Paired Box Gene 6

pb: pares de bases.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

pH: potencial hidrógeno

PIO: presión intraocular

POT: protection of telomeres

rpm: revoluciones por minuto

SDS: dodecil sulfato sódico

SNP: single nucleotide polymorphism

T: timina

tADN: ADN telomérico

TERC: Telomerase RNA component

TERT: telomerasa transcriptasa inversa

Tm: temperatura de fusión.

TRF1/2: telomeric repeat binding factor 1 and 2

UVA/UVB: rayos ultravioleta tipo A o B

UV-R: radiación ultravioleta

µg: microgramo

µl: microlitro

µm: micrometro

µM:micromol



# ÍNDICE

---





<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1. EL CRISTALINO .....</b>	<b>3</b>
1.1 EMBRIOGÉNESIS, ESTRUCTURA Y FUNCIÓN .....	3
1.2 TRANSPARENCIA DEL CRISTALINO .....	7
<b>2. LA CATARATA.....</b>	<b>8</b>
2.1 CLASIFICACIÓN .....	8
2.2 EPIDEMIOLOGÍA.....	11
2.3 FACTORES DE RIESGO .....	12
2.4 PATOGÉNESIS DE LA CATARATA .....	18
2.5 GENÉTICA DE LA CATARATA.....	19
2.5.1 POLIMORFISMOS	
2.5.2 GENES REPARADORES DE ADN	
2.5.3 TELÓMEROS	
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
<b>PACIENTES Y MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
<b>1. PACIENTES .....</b>	<b>35</b>
<b>2. MÉTODOS .....</b>	<b>38</b>
2.1 AISLAMIENTO DE ADN DE ALTO PESO MOLECULAR.....	38
2.1.1 OBTENCIÓN DE MUETRAS DE SANGRE PERIFÉRICA	
2.1.2 OBTENCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA	
2.1.3 AISLAMIENTO DEL ADN TOTAL DE ALTO PESO MOLECULAR	
2.1.4 PURIFICACIÓN DEL ADN	
2.1.5 CUANTIFICACIÓN DEL ADN	
2.2 DISCRIMINACIÓN ALÉLICA DE POLIMORFISMO MEDIANTE PCR CON SONDAS TAQMAN .....	40
2.3 ESTUDIO DE LA LONGITUD TELOMÉRICA MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL CUANTITATIVA COMPARATIVA .....	45

<b>3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>49</b>
3.1 SPSS.....	49
3.2 GENEX .....	49
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>53</b>
<b>1. DATOS DEMOGRÁFICOS.....</b>	<b>53</b>
1.1 PACIENTES.....	53
1.2 SEXO .....	53
1.3 EDAD .....	54
1.4 FACTORES DE RIESGO .....	54
<b>2. ESTUDIO DE LA LONGITUD DE TELÓMEROS .....</b>	<b>56</b>
<b>3. ANÁLISIS LOS FACTORES DE RIESGO Y LA LONGITUD</b>	
<b>TELOMÉRICA.....</b>	<b>58</b>
<b>4. ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS <i>TERT-1327C&gt;T</i> Y <i>TERC-63G&gt;A</i> .....</b>	<b>60</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>65</b>
<b>1. ESTUDIO DE LOS FACTORES DE RIESGO Y LA CATARATA.....</b>	<b>68</b>
<b>2. ANÁLISIS DE LOS TELÓMEROS Y LOS POLIMORFISMOS DE LA</b>	
<b>TELOMERASA EN CATARATAS.....</b>	<b>72</b>
<b>3. LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....</b>	<b>77</b>
<b>4. PERSPECTIVAS DE FUTURO .....</b>	<b>78</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>79</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>83</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>109</b>
ANEXO 1.....	115
ANEXO 2.....	117

# INTRODUCCIÓN

---



## **1. EL CRISTALINO**

### 1.1 EMBRIOGÉNESIS, ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

El cristalino es una estructura transparente de consistencia blanda y elástica, con morfología de lente biconvexa, anatómicamente situada por detrás del iris y suspendida por la zónula a nivel del eje visual. No contiene nervios ni aporte sanguíneo, por lo que su nutrición se realiza a través del humor acuoso y del humor vítreo <sup>1,2</sup>.

Actúa durante la acomodación como una lente de graduación variable, entre 15 y 20 dioptrías. Con la edad el cristalino pierde su función y como consecuencia, aparece la presbicia debido a un aumento de la curvatura, disminución del índice de refracción y de la flexibilidad y aumento de proteínas insolubles <sup>2</sup>.

El desarrollo del globo ocular comienza en la cuarta semana, a nivel del extremo caudal del embrión, dando lugar a la aparición de los surcos ópticos en los pliegues neurales. La fusión de dichos pliegues forma el encéfalo anterior, al mismo tiempo que los surcos ópticos se transforman en dos vesículas ópticas, que se proyectan a ambos lados del encéfalo anterior.

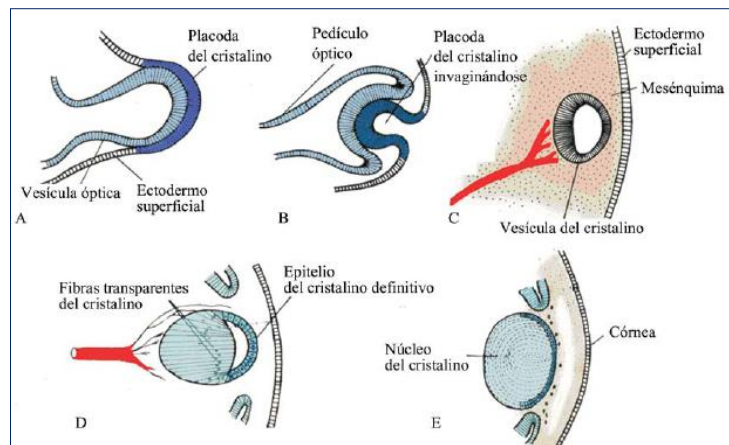
El ectodermo superficial de las vesículas se espesa para formar la placoda del cristalino, la cual, sufre una invaginación y se convierte en la fosita del cristalino, cuyos bordes al acercarse se fusionan constituyendo las vesículas cristalinianas.

Las vesículas ópticas se invaginan y dan lugar a la cúpula óptica de doble capa. En ese mismo momento éstas se separan del ectodermo superficial y en los tallos ópticos se generan las fisuras ópticas. A partir del mesénquima de las fisuras se desarrollan los vasos sanguíneos hialoideos, al final del primer trimestre, que posteriormente, durante el séptimo mes, se van atrofiando hasta quedar sólo como un vestigio denominado canal de Cloquet <sup>3,4</sup>.

El cristalino se origina a partir de la vesícula del cristalino. La vesícula es hueca con paredes formadas por células cilíndricas ectodérmicas, que se sitúan en la pared

posterior y se van extendiendo hasta la pared anterior (fibras primarias) (figura 1), con gran actividad mitótica y constituidas en más de un 90% por proteínas cristalinas  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ <sup>5</sup>.

Con el desarrollo embrionario, las células cilíndricas de la pared anterior muestran una disminución de su actividad mitótica quedando limitada a las situadas cerca del ecuador, que se dividen (fibras secundarias)<sup>2</sup> y se disponen en capas de cebolla durante toda la vida sobre las primarias<sup>5</sup>. Así, las células periféricas del epitelio anterior van a originar el córtex y las centrales, que han perdido actividad mitótica, darán lugar al núcleo<sup>6</sup>.

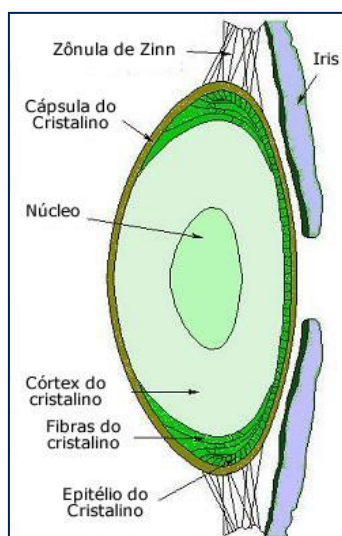


*Figura 1: Desarrollo embriológico del cristalino.*

El cristalino durante su desarrollo se encuentra irrigado por la parte distal de la arteria hialoidea, aunque se torna avascular en el periodo fetal.

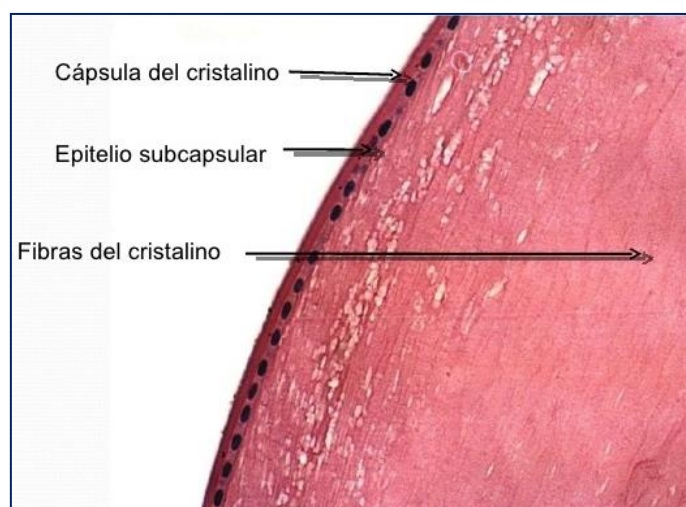
Macroscópicamente (figura 2) el cristalino posee una forma biconvexa, elipsoideo en su polo anterior y más curvo en su polo posterior. Su peso varía de 65 grs en el neonato a unos 250 grs en la madurez y sus dimensiones de 3,5 +/- 3 mm al nacimiento hasta 6,8 +/- 3 mm en la edad adulta<sup>7</sup>.

INTRODUCCIÓN



*Figura 2: Estructura macroscópica del cristalino.*

Histológicamente el cristalino adulto se diferencia en 4 estructuras: cápsula, epitelio subcapsular, córtex y núcleo (figura 3).



*Figura 3: Partes histológicas del cristalino.*

La cápsula es la membrana basal de las células epiteliales y está compuesta de colágeno tipo I, II, IV, y laminina, inmersos en un componente de glucoproteínas y glucosaminoglicanos (entactina, proteoglicano, heparansulfato, y fibronectina) con características metacrómicas para la tinción, basófila y PAS + <sup>8,9</sup>.

El epitelio subcapsular, ausente en la porción posterior, origina las fibras primarias durante el desarrollo. Está formado por una monocapa de células cúbicas conectadas entre sí por uniones tipo ocludens, con pocas organelas y gran cantidad de microtúbulos y filamentos <sup>2</sup>.

En función de la localización presenta distintas características histológicas <sup>10</sup>, siendo la zona intermedia o pregerminal y, en mayor medida, la zona ecuatorial o germinal las encargadas de dividirse mediante mitosis para formar fibras secundarias. Las zonas germinal y pregerminal suponen el 90% de las fibras del epitelio.

El córtex está formado por fibras hexagonales superpuestas en capas de cebolla que derivan de células epiteliales. Pierden su núcleo y organelas según pasan a originar el núcleo y lo hacen en forma de Y en las líneas de sutura, una anterior y otra posterior.

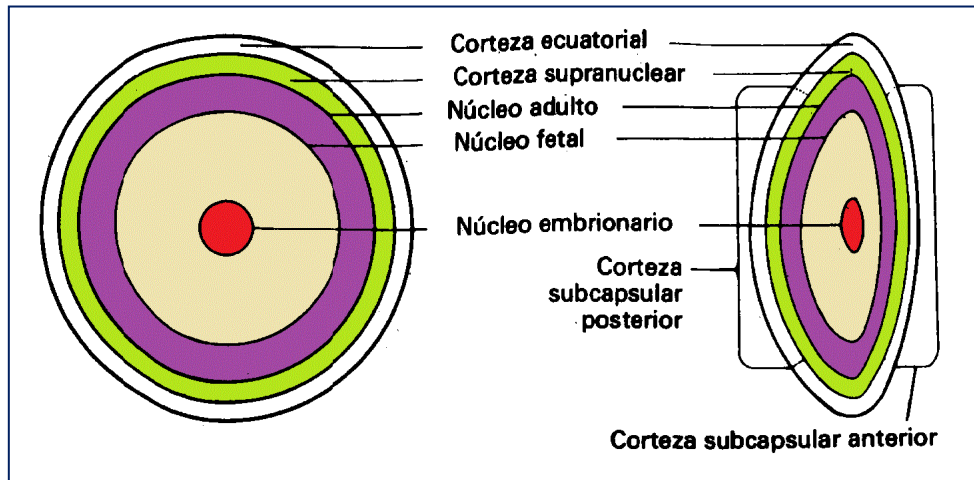
El núcleo constituye la zona central del cristalino. Es más denso que la corteza, ya que las fibras están estrechamente enlazadas entre sí y las células pierden su núcleo, sus lípidos y el contenido líquido para ir solidificando por deshidratación. El núcleo irá ocupando la mayor parte del cristalino sustituyendo al córtex más blando y flexible <sup>2</sup>.

La lecitina y el colesterol aumentan con la edad, al igual que las escleroproteínas (albuminoide) y diversas albúminas y globulinas, siendo estas últimas responsables de la opacidad central del cristalino <sup>2</sup>.

En relación con el desarrollo y con los criterios de crecimiento <sup>11</sup> el núcleo está dividido (figura 4) en:

- Núcleo embrionario, compuesto de fibras primarias.
- Núcleo fetal, compuesto del núcleo embrionario y fibras secundarias acumuladas hasta el parto.
- Núcleo infantil, compuesto por el núcleo fetal y fibras secundarias acumuladas hasta los cuatro años de vida.
- Núcleo adulto, compuesto por el núcleo infantil y fibras secundarias acumuladas sobre el mismo, hasta la edad adulta <sup>11,12</sup>.





*Figura 4. Estructura nuclear del cristalino*

## 1.2 TRANSPARENCIA DEL CRISTALINO

La luz visible (400- 750 nm de longitud de onda) que penetra en el ojo estimula los fotorreceptores de la retina y permite el fenómeno de la visión. La córnea es capaz de absorber la luz de menor longitud de onda ( $< 295 \text{ nm}$ ) y el cristalino la luz entre 295-400 nm.

La capacidad del cristalino de refractar y enfocar la luz sobre la retina está determinada por su alto contenido en proteínas, hasta un 60% del peso<sup>13</sup>. El núcleo, al ser la zona con mayor concentración proteica, permite que el índice de refracción necesario para el enfoque de imágenes sea máximo. La transparencia de las fibras cristalinianas depende de varios factores<sup>14,15</sup>:

- El peso molecular de las proteínas del cristalino.
- La concentración y la fracción del volumen de las proteínas.
- Las interacciones moleculares que determinan la organización de las proteínas dentro del plasma.

Estas proteínas que forman parte del cristalino son las cristalinas, las proteínas del citoesqueleto (filamentos arrosariados)<sup>16</sup>, las proteínas de la membrana (MP26 y aquaporinas de las uniones estrechas), las conexinas y la N-cadherina localizadas en las

uniones de hendidura que preservan la osmoregulación y el ambiente intracelular <sup>17</sup>. Las catalasas y las reductasas de glutatión son importantes también en el mantenimiento del ambiente reducido del cristalino <sup>18</sup>.

Finalmente, el factor de transcripción PAX-6 regula de manera determinante la formación de la arquitectura del cristalino <sup>19</sup>.

## **2. LA CATARATA**

La catarata se define como la opacificación total o parcial del cristalino que provoca que la luz se disperse dentro del ojo y no pueda enfocarse en la retina, creando imágenes difusas. Es considerada la causa más frecuente de ceguera reversible en el mundo <sup>20,21</sup>.

### **2.1 CLASIFICACIÓN**

La clasificación de la catarata <sup>22</sup> puede realizarse desde un aspecto:

#### **1. CLÍNICO**

En función de la edad de aparición <sup>23,24</sup>:

- Congénitas: Se manifiestan en el momento del nacimiento <sup>25</sup>:
  - Anteriores (polar anterior y subcapsular anterior).
  - Centrales (nuclear, zonular y suturaria).
  - Posteriores (subcapsular posterior, lenticono posterior, persistencia de la vasculatura fetal y gota de aceite).
  - Difusas (cristaliniana, cerúlea, total y membranosa).
- Juveniles: Generalmente son unilaterales y están ocasionadas por una falta de estimulación nerviosa durante el desarrollo visual, el cual se produce hasta los 6-7 años de vida. En estos casos la catarata puede generar una ambliopía.

- Preseniles: No hay consenso sobre la edad de aparición de estas cataratas. Hay autores que incluyen en esta clasificación a las cataratas que se presentan en menores de 50 años, mientras que hay otros que las consideran en menores de 60 años <sup>26,27</sup>. Se relacionan con enfermedades sistémicas, como por ejemplo la diabetes, dermatitis atópica, neurofibromatosis tipo II o distrofia miotónica.
- Seniles: Es el tipo más frecuente de catarata, justificada por el envejecimiento, ya que es el factor de riesgo más importante asociado a su desarrollo <sup>28,29,30</sup>.

## **2. BIOMICROSCÓPICO**

En relación al lugar opacificado se clasifican en nuclear, cortical anterior y posterior, y subcapsular anterior y posterior. Existen diferentes sistemas de clasificación:

### ❖ *The Lens Opacities Classification System (LOCS)*

La clasificación LOCS III <sup>31,32</sup> es la más utilizada. Expande las escalas que definen la opacidad nuclear y valora grados más precoces de catarata subcapsular, desarrollando así una escala decimal que define con precisión el tipo y grado de catarata.

Se emplean tres series de fotografías, una primera para baremar la opacidad y opalescencia nuclear, y una segunda y tercera, tomadas por retroiluminación en la lámpara de hendidura para graduar las cataratas corticales y las cataratas subcapsulares posteriores.

Así, en función de estas imágenes, podemos clasificar las cataratas en (figura 5):

- Nuclear: 6 niveles de opacidad nuclear descritos con las iniciales NO (nuclear opalescencia) o NC (nuclear color) y el número del 1 al 6 según su coloración, siendo 1 las cataratas más incipientes y reservándose el 6 para las más brunescentes.
- Cortical: 5 niveles de gradación definidos con la letra C.

- Opacidades posteriores: 5 niveles denominados con la letra P seguida del número del 1 al 5 en función de la intensidad de la opacidad.

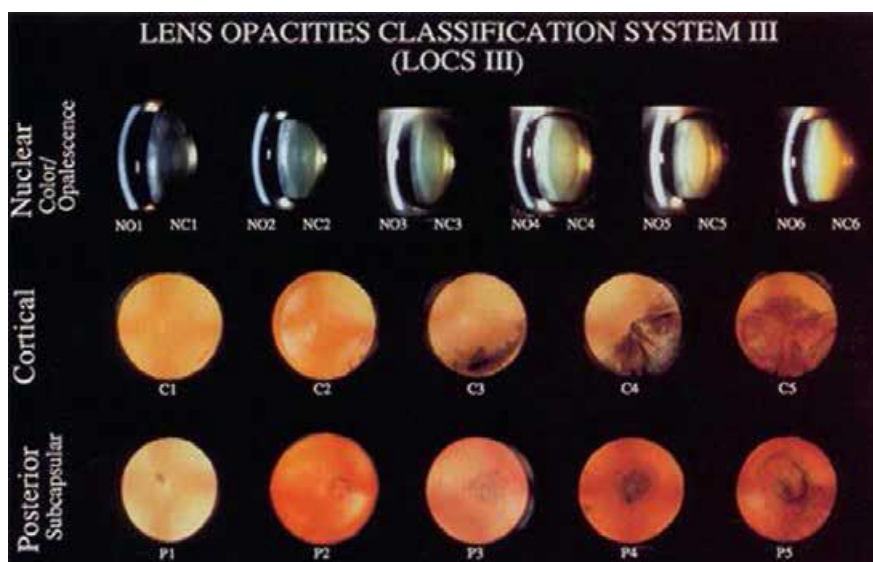
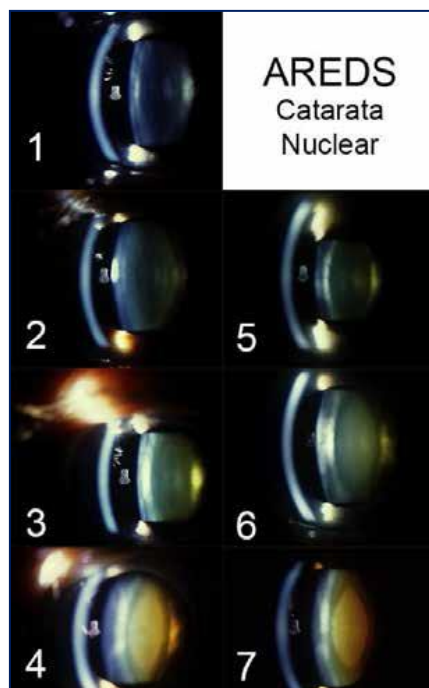


Figura 5: El sistema de clasificación de cataratas LOCS III <sup>33</sup>.

❖ *The Age-Related Eye Disease Study (AREDS) system (AREDS,2001)*

Combina imágenes obtenidas por lámpara de hendidura y por retroiluminación, diferenciando por un lado la opacidad nuclear (con escala numérica del 0,9 al 7,1) y por otro la opacidad cortical y subcapsular posterior (medida sobre una gradilla con distintas marcas) (figura 6).



*Figura 6: Escala de clasificación de las cataratas según el ARED-S.*

- ❖ *The Oxford Clinical Cataract Classification and Grading System* <sup>34</sup>.

Define las zonas del cristalino en función de la dispersión de la luz, dividiendo en zona nuclear y cortical.

- ❖ *El Beaver Dam Eye Study* <sup>35</sup>.

- ❖ *The National Eye Institute Scheimpflug system* <sup>22</sup>.

## 2.2 EPIDEMIOLOGÍA

La catarata es la principal causa de ceguera reversible en el mundo <sup>36,37,38</sup>. Se relaciona aproximadamente con el 50% de los casos de ceguera en la población. Existen escasos estudios sobre la prevalencia de cataratas en la población española, y en especial sobre las cataratas preseniles, siendo más frecuentes los realizados en países en vías de desarrollo <sup>39,40</sup> como África, Asia y Sudamérica <sup>41</sup>. Esto es debido a una mayor prevalencia de la catarata justificada por una dificultad de acceso a una atención médica adecuada <sup>42,43</sup>, así como a la constante exposición a los rayos ultravioleta (UVA) sin protección a la que, por su situación geográfica, se ve sometida la población de

estos países. La luz ultravioleta ha sido descrita como un factor de riesgo que precipita la aparición de cataratas<sup>28,44-47</sup>.

En los países desarrollados, el aumento en la esperanza de vida conlleva un incremento significativo de la prevalencia de cataratas en las últimas décadas<sup>48</sup>, mayor en mujeres que en hombres<sup>49,50</sup>, debido al aumento de la esperanza de vida de éstas, así como a factores hormonales.

El estudio Beaver Dam Eye Study analizó la prevalencia de los distintos tipos de cataratas en una población de 43 a 84 años, siendo el tipo nuclear el más frecuente, el 17,3% de la población presentaba un nivel de opacidad 3 sobre 5, el 16,3% de los pacientes mostraba opacidades de tipo cortical y tan sólo un 6,0% manifestaba el tipo subcapsular posterior. Los subtipos cortical y nuclear eran los más frecuentes en las personas de mayor edad<sup>45,51-55</sup>.

### 2.3 FACTORES DE RIESGO

La catarata es una enfermedad en la cual interfieren múltiples factores de riesgo<sup>56</sup> recogidos en la tabla 1, cuya prevención puede resultar de utilidad para retardar la aparición de esta patología<sup>33</sup>.

Factor	Odd Ratio (95% IC)	Posible factor etiológico	Estudio
<b>Tratamiento anti-hipertensivo</b>	6,2(2,1-18,4)	Cianato de la urea (o glucosa)	Chen et al
<b>Furosemida</b>	2,0( 1,2-3,3)		Szmyd and Schwart
<b>Hipertensión</b>	1,5(1,06-2,1)		Szmyd and Schwart
<b>Insuficiencia cardiaca</b>	3,4(1,6-7,4)		Chen et al
<b>Trabajo en bases militares</b>	2,5 (1,1-5,7)	Radiación microondas	Harding and van Hwyningen
<b>Alcoholismo</b>	2,3(1,07-5,0)	Acetaldehído	Harding and van Hwyningen
<b>Consumo importante de tabaco:</b>			
- presente	2,9(1,4-5,9) Dosis dependiente	Tiocianato, cianato y epóxidos	Flaye et al
- pasado	2,6(1,4-5,0)		West et al
<b>Diabetes:</b>	4,2 (2,6-7,0)		Harding et al
-hombres	1,8 (1,2-2,6)		Szmyd and Schwart
-mujeres	3,4 (1,8-6,4)	Glucosa y sus metabolitos	Harding et al
	6,0 (2,6-14,2)		Harding et al
<b>Miopía</b>	1,7 (1,2-2,4)		Harding et al
<b>Glaucoma</b>	2,9 (1,5-5,7)		Harding et al
<b>Cirugía glaucoma</b>	14,3 (3,3-62)	Trauma	Harding et al
<b>Neuropatía periférica</b>	1,5 (1,1-1,9)	Modificación proteica	Harding et al
<b>Diarrea severa</b>	1,7(1,1-2,8)	Cianato de la urea	Harding et al
<b>Óxido de etileno</b>	5,6	Óxido de etileno	Deschamp et al
<b>Déficit de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa</b>	-	Glutation oxidado Galactosa	Yuregir et al
<b>Leche</b>	-		Bhatnagar et al

*Tabla 1: Diferentes factores de riesgo asociados a catarata y estudios que los analizan <sup>57</sup>.*

## *EDAD*

El envejecimiento implica cambios a nivel celular que se acumulan con el tiempo y que conllevan una pérdida funcional. Es un proceso no homogéneo, de manera que los diferentes órganos y tejidos, entre ellos el cristalino, pueden envejecer de forma asimétrica <sup>56</sup>.

La edad avanzada es el principal factor de riesgo asociado a la aparición de cataratas, ya que se ha observado un aumento de su prevalencia con la edad <sup>29,56</sup> debido a los cambios progresivos y secuenciales que sufren las proteínas cristalinas con el envejecimiento.

Como hemos explicado anteriormente, se produce una adición fibrilar al cristalino y una diferenciación terminal secuencialmente programada de éstas, volviéndose en cierto grado metabólicamente inactivas y aumentando por tanto su densidad con el paso de los años <sup>58-60</sup>.

## *TABACO Y ALCOHOL*

Múltiples estudios han corroborado una relación entre el tabaco y las enfermedades oculares como la degeneración macular asociada a la edad, la formación de cataratas, la orbitopatía tiroidea, la retinopatía diabética o la inflamación ocular <sup>61,62</sup>.

Tanto el estudio realizado en Edimburgo <sup>63</sup>, como el llevado a cabo en Maryland <sup>64</sup>, no demuestran que exista asociación entre la aparición de cataratas y el tabaco. En el primer caso podría deberse a que sólo se tiene en cuenta a los pacientes fumadores en el momento de la investigación, sin llevar a cabo un análisis prospectivo de aquellos que han fumado en el pasado y que posteriormente desarrollaron cataratas. El segundo estudio sí determina una mayor progresión en la formación de catarata nuclear en los pacientes fumadores actuales.

No obstante, el análisis efectuado en raza caucásica en Estados Unidos <sup>65</sup> y el estudio Andhra Pradesh <sup>66</sup> realizado en población de la India, sí encuentran correlación entre el tabaco y el desarrollo de cataratas <sup>67</sup> evidenciándose incluso una asociación dosis



dependiente. El daño oxidativo favorecido por la disminución de antioxidantes endógenos debido al tabaco podría ser la causa <sup>68,69</sup>.

Respecto al consumo de alcohol y la aparición de cataratas, el ensayo Beaver Dam Study y el que tiene lugar en Maryland encuentran un vínculo entre el consumo diario de alcohol (tanto moderado como severo) y el desarrollo de cataratas <sup>69,70</sup>, sobre todo subcapsulares posteriores <sup>71</sup>.

### *DIABETES MELLITUS*

La retinopatía diabética es la principal causa de ceguera legal en el mundo. La incidencia de la catarata y su progresión en los pacientes diabéticos es mayor que en el resto de la población <sup>72-74</sup>, hallándose además, tasas de complicaciones más elevadas en la cirugía de cataratas de estos pacientes <sup>75-77</sup>.

El enzima Aldolasa Reductasa cataliza la reducción de la glucosa a sorbitol a través de la vía de polyol <sup>78</sup>. El acúmulo de sorbitol produce cambios osmóticos que ocasionan la degeneración hídrica de las fibras del cristalino y la consecuente aparición de cataratas <sup>79-81</sup>. Este estrés osmótico <sup>82</sup>, induce la apoptosis de las células epiteliales del cristalino <sup>83,84</sup> de forma más notoria en pacientes jóvenes con diabetes mellitus (DM) tipo 1 <sup>84,85,86</sup>.

### *HIPERTENSIÓN ARTERIAL*

Diferentes estudios han evaluado la hipertensión arterial (HTA), tanto la sistólica <sup>73</sup> como la diastólica <sup>87,88,89</sup>, y las líneas de tratamiento antihipertensivo <sup>90</sup> en relación a la formación de cataratas, aunque los resultados han sido diversos.

Por un lado, los estudios que no han encontrado relación como El Beaver Dam Eye Study <sup>52</sup> llevado a cabo en caucásicos americanos, probablemente debido a la escasez en la muestra.

Por otro, los que demuestran asociación como El Barbados Eye Study <sup>91</sup>, realizado por Leske y colaboradores en pacientes de raza negra, o el Allen Park Michigan Veterans Administration Medical Center <sup>92</sup> y el Physicians Health Study <sup>93</sup> donde se observa una

relación entre la catarata y la presión arterial sistólica elevada, pero no con la presión arterial diastólica ni con la hipertensión <sup>94</sup>.

### *LUZ SOLAR Y RADIACIÓN*

Los componentes de la luz solar más dañinos para la salud son las radiaciones UV tipo A y B. Debido a la pérdida de la capa de ozono, se ha producido un aumento en el componente UV- B de radiación ultravioleta de entre 280-315 nm que alcanza la superficie terrestre <sup>46,95</sup>.

A nivel ocular los efectos de la radiación pueden ser de tipo agudo o aparecer a largo plazo, bien tras una corta exposición a radiación de gran intensidad o bien por exposición prolongada a intensidades de radiación menores. Estas radiaciones pueden condicionar el desarrollo de queratitis, pterigion o cataratas <sup>44-46,96,97</sup>, sobre todo de tipo cortical <sup>98</sup>.

La aparición de cataratas se debe a la luz reflejada <sup>99</sup>. La dispersión y reflexión de la luz por las nubes aumenta la cantidad de radiación difusa incidente en el ojo <sup>100,101</sup>.

Múltiples fármacos radio sensibilizantes a la luz solar podrían estar asociados a una mayor incidencia de catarata <sup>102</sup>.

Las cataratas inducidas por radiación han sido descritas en modelos animales un año después del descubrimiento de los rayos-X por Roentgen en 1895 <sup>103,104</sup>. Con mayor frecuencia suelen desarrollarse entre 6 meses y un año de la exposición, sin embargo pueden producirse cataratas por radiación ionizante incluso tras 35 años de la exposición <sup>105</sup>.

Se cree que es debida a daños en el ADN nuclear del epitelio cristalino situado en el ecuador, produciéndose una diferenciación y migración anormal hacia el área subcapsular posterior de las fibras de elongación <sup>106</sup>.

### *CORTICOIDES*

Los efectos adversos a nivel ocular derivados del uso de corticoides han sido ampliamente estudiados, siendo la elevación de la presión intraocular (PIO) y la aparición de cataratas los más frecuentes.

Se ha descrito la formación de cataratas subcapsulares posteriores en pacientes a los que se les ha administrado corticoides por vía sistémica, tópica, subconjuntival, inhalatoria e incluso intravítreos.

La utilización de corticoides por vía oral durante más de 1 mes se ha relacionado con el desarrollo de cataratas subcapsulares posteriores, asociación que también se ha observado con el uso de los inhalados <sup>90,98</sup>.

Algunos estudios indican que podría existir una cierta susceptibilidad individual <sup>107</sup> para desarrollar cataratas secundarias a corticoides <sup>108</sup> independientemente de la edad, el tipo de corticoide, la dosis total o la duración del tratamiento.

### *TRAUMATISMOS*

A diferencia de las cataratas primarias, las cataratas traumáticas suelen ser unilaterales.

Este tipo de cataratas se pueden presentar como consecuencia de cualquier tipo de traumatismo ocular <sup>109-112</sup>, aunque se ha visto con mayor frecuencia en los de tipo penetrante o en laceraciones corneales que suelen involucrar al iris <sup>113-116</sup>.

### *CATARATAS SECUNDARIAS A ENFERMEDADES LOCALES O SISTÉMICAS*

Dentro de las relacionadas con enfermedades oftalmológicas destacan las producidas por uveítis de repetición, donde la catarata se produce bien por la inflamación ocular o bien por el tratamiento con corticoides, y las asociadas a la miopía magna o el glaucoma.

En el grupo de las enfermedades sistémicas que conllevan una mayor incidencia de cataratas encontramos la distrofia miotónica de Steinert, el síndrome de Down <sup>117</sup>, la

neurofibromatosis tipo 2<sup>118</sup>, la dermatitis atópica o las enfermedades metabólicas<sup>119</sup> o de depósito. En su mayoría la opacidad que producen es de tipo subcapsular posterior y suele tratarse de cataratas bilaterales.

## 2.4 PATOGÉNESIS DE LA CATARATA

El proceso de envejecimiento supone uno de los factores principales en la formación de cataratas. Con el paso de los años se van produciendo cambios en las propiedades del cristalino:

### *AUMENTO DE LA DENSIDAD*

Después de los 40 años, de manera más evidente, se produce la formación de agregados proteicos insolubles. Éstos conllevan a un aumento de la dispersión de la luz y variaciones en la densidad nuclear<sup>56</sup>.

### *PÉRDIDA DE ELASTICIDAD*

A partir de los 40 años aumenta la rigidez del cristalino<sup>120</sup>, en mayor grado a nivel del núcleo que del córtex<sup>121</sup>, determinando el desarrollo de la presbicia<sup>122</sup>.

### *CAMBIOS EN LAS PROTEÍNAS*

Con el envejecimiento se producen:

- *Cambios post-traduccionales*: las alteraciones de tiolación, deamilación, glicación, carbamilación, cismetilación, fosforilación y acetilación, así como proteólisis, llevan al truncamiento y liberación de fragmentos de cristalinas<sup>30,123</sup>, conduciendo a una pérdida de la transparencia cristaliniana.

A la vez que las cristalinas  $\beta$  y  $\gamma$  son oxidadas, favorecida por el envejecimiento al disminuir las concentraciones de glutatión reducido, también lo hacen las cristalinas  $\alpha A$  y  $\alpha B$ , produciéndose una pérdida de la actividad de las chaperonas, lo que da lugar

a un acúmulo de fragmentos proteicos en las fibras cristalinas, más evidente a nivel nuclear que cortical <sup>124</sup>.

Aunque en el cristalino existe una vía que elimina y degrada las proteínas oxidadas, el sistema ubiquitina-proteosoma, su actividad decae con la edad <sup>56,125</sup>, suponiendo todo ello la acumulación de residuos.

- *Cambios conformacionales*: existe un endurecimiento progresivo, sobre todo a nivel nuclear, debido a la formación de agregados de alto peso molecular que producen la insolubilidad proteica.

Esto, junto al acúmulo de cromóforos fluorescentes, produce un cambio en la coloración nuclear, pasando desde el amarillo en fases iniciales, al marrón en casos más avanzados <sup>56</sup>.

- *Pérdida de la función de las chaperonas*: la alteración de la actividad de las proteínas chaperonas  $\alpha$ , máxima a los 50 años, contribuye a la agregación de proteínas de tipo  $\beta$  y  $\gamma$  <sup>56</sup> y a la falta de solubilidad proteica con la consecuente carencia de transparencia <sup>126</sup>.

- *Pérdida de la capacidad anti-oxidante y de neutralización de radicales libres* <sup>97</sup>: la cantidad de glutatión reducido decrece de manera casi lineal con la edad <sup>127</sup>, aumentando el glutatión oxidado.

A nivel nuclear se observa una disminución de la cisteína, que implica una falta de protección frente al daño oxidativo. A nivel cortical se produce un aumento de la permeabilidad de la membrana celular, con la consecuente acumulación de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares junto a un descenso en la actividad de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATP-asa, lo que conlleva una hiperhidratación celular y pérdida proteica <sup>128</sup>.

## 2.5 GENÉTICA DE LA CATARATA

EL ácido desoxirribonucleico o ADN es capaz de almacenar y transmitir la información genética, además de dirigir el proceso de síntesis de proteínas y su expresión en un

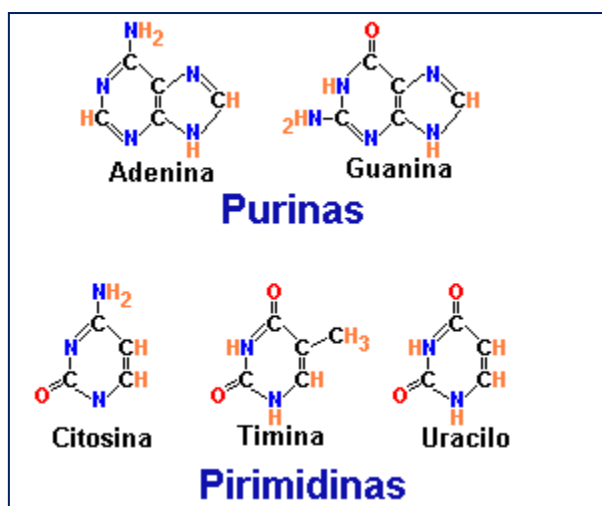
determinado fenotipo. Se denomina fenotipo a la manifestación externa de la carga genética o genotipo.

La estructura del ADN consiste en polímeros de nucleótidos, formados por tres tipos de moléculas: pentosa (desoxirribosa en el ADN, ribosa en el ácido ribonucleico (ARN)), bases nitrogenadas y ácido fosfórico.

La unión aislada de la pentosa y la base nitrogenada se denomina nucleósido.

Las bases nitrogenadas se pueden clasificar en (figura 7):

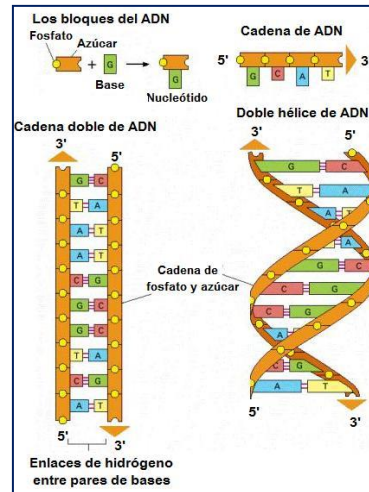
- Púricas: la adenina (A) y la guanina (G).
- Pirimidínicas: la citosina (C), timina (T) y uracilo (U). Este último no forma parte de la estructura del ADN, sino del ARN.



*Figura 7: Tipos de bases nitrogenadas.*

En 1953 se produce el descubrimiento por Watson y Crick de la estructura del ADN como una doble hélice (3'-5') formada por dos cadenas complementarias de nucleótidos con bases enfrentadas entre sí, de tal modo que la adenina se encuentra unida a la citosina mediante dos puentes de hidrógeno, y la guanina a la timina por tres puentes de hidrógeno (figura 8).

INTRODUCCIÓN



*Figura 8: Estructura de la doble hélice del ADN*

### 2.5.1 POLIMORFISMOS

Se denomina polimorfismo a las variaciones en la secuencia de las bases del ADN entre individuos de una población que presentan una frecuencia de al menos un 1%.

Existen más de diez millones de polimorfismos en el genoma humano que se manifiestan con una frecuencia relativamente alta.

Los polimorfismos, al igual que las mutaciones, pueden consistir en la sustitución de un nucleótido por otro, en la inserción de uno o varios nucleótidos nuevos, o en la delección de nucleótidos previamente existentes. Así mismo, estos procesos pueden competir a un número variable de bases, pero lo más frecuente es que sólo se afecte un nucleótido, lo que se denomina Single Nucleotide Polymorphism o SNP <sup>129</sup>.

Según su localización los polimorfismos pueden incumbir a regiones codificantes o no codificantes del ADN.

- Aquellos que en las regiones codificantes producen un cambio de aminoácido se denominan no sinónimos y son los que en mayor proporción alteran la función de la proteína y por tanto, los más estudiados. Si este cambio introduce un codón de parada se denomina mutación nonsense, mientras que si codifica un nuevo aminoácido será una mutación de cambio de sentido (missense) <sup>130</sup>.

- Si la mutación al traducirse no produce ningún cambio en la secuencia aminoacídica se dice que es sinónima o silente. Las mutaciones de las zonas no codificantes son también importantes porque pueden producir una alteración del splicing, o impedir la unión de factores de transcripción <sup>129,130</sup>.

## 2.5.2 GENES REPARADORES DE ADN

El ADN puede sufrir alteraciones o mutaciones por las agresiones externas, especialmente por el estrés oxidativo <sup>131</sup>. En el caso de las cataratas son numerosos los estudios que han tratado de relacionar el daño en el ADN de las células epiteliales del cristalino con diversos factores como la luz y su desarrollo <sup>18,44-47,98,132,133</sup>.

Sin embargo, no todas las modificaciones en el ADN desencadenan una respuesta patológica. Esto es debido a que existen enzimas reparadores del ADN que corrigen y eliminan los residuos de nucleótidos dañados por distintas causas como la exposición a componentes citotóxicos o agentes carcinógenos <sup>134</sup>.

Existen cuatro mecanismos de reparación del ADN <sup>135</sup> (Figura 9):

- Mismatch Repair (MMR) <sup>136</sup>.
- Reparación por escisión de bases (BER).
- Reparación de rotura de doble cadena (DSBR) <sup>137</sup>.
- Reparación por escisión de nucleótidos (NER) <sup>138,139</sup>.



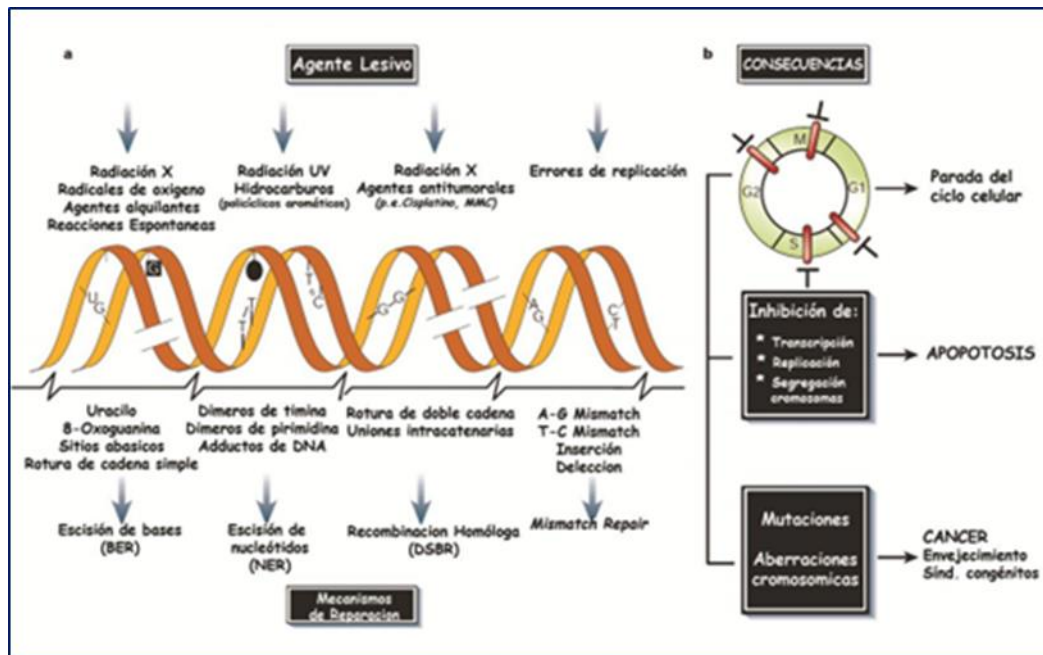


Figura 9: Consecuencias de las diferentes vías de reparación del ADN <sup>135</sup>.

Este grupo de genes codifican proteínas que reconocen el daño en el genoma celular y se encargan de subsanarlo. Postergan la replicación celular hasta que las lesiones en su ADN hayan sido rectificadas y, en caso contrario, inducen la apoptosis celular para evitar su transmisión <sup>140</sup>. Cuando estos mecanismos fallan, el daño se transmite a las células descendientes pudiendo iniciarse procesos como la carcinogénesis.

Se ha propuesto que polimorfismos en los genes reparadores del ADN pueden reducir su capacidad reparadora y por lo tanto, aumentar el riesgo de sufrir enfermedades o incluso inducir una mayor susceptibilidad al envejecimiento <sup>141-145</sup>.

### 2.5.3 LOS TELÓMEROS

Los telómeros son regiones de ADN no codificante que consisten, en la mayoría de los organismos, en repeticiones en tándem de una secuencia corta de nucleótidos, variando el número de repeticiones de unos organismos a otros. Están situados en la parte final de los cromosomas eucariotas junto con sus proteínas asociadas. Juegan un papel muy importante en la integridad y estabilidad genómica y participan en el proceso de daño/reparación del ADN celular <sup>146,147</sup>.

La longitud telomérica disminuye en cada ciclo de división celular, aunque la célula posea los mecanismos necesarios para completar su replicación. Si esto no ocurriera, la célula podría llegar a perder información genética importante o adquirir un estado de inmortalidad que produciría una proliferación celular desmesurada de la línea celular <sup>148</sup>.

En la especie humana los telómeros están formados por repeticiones de 6 nucleótidos: T2AG3 a diferencia de las secuencias subteloméricas, las cuales se ubican en zonas contiguas a los telómeros y se hallan formadas por repeticiones en tándem altamente polimórficas.

El ADN telomérico (tADN) consiste en dos hebras desiguales. Su extremo 3' está enriquecido con Guaninas y Citosinas repartidas de forma asimétrica. Las Guaninas se acumulan en la hebra con orientación 5' → 3' denominada hebra G. Las Citosinas se acumulan en la hebra con orientación 3' → 5'. La hebra G no se encuentra apareada con la otra hebra en la parte extrema, sino que forma un segmento monofibrilar, de longitud variable según las especies y que constituye el extremo 5' del cromosoma. El extremo monofibrilar adopta una estructura secundaria por apareamiento de las bases de Guanina (D-loop). El extremo telomérico forma un bucle hacia atrás y crea un dúplex de ADN con otra de las secuencias repetidas (T-loop) que desplaza al dúplex original del telómero. Esta estructura en forma de lazo se estabiliza gracias a la unión de proteínas específicas que se unen a los telómeros <sup>149</sup>. En el caso de las levaduras de fisión y de los humanos, la proteína que se une y protege el extremo de ADN de cadena sencilla de la hebra G es la  $\alpha$  proteína POT1 <sup>150</sup>.

Existen otras proteínas que se unen a lo largo de las repeticiones teloméricas dando lugar a un complejo ribonucleoproteico altamente ordenado <sup>151</sup>. Es el caso de TRF-1 y TRF-2, dos proteínas que se asocian mediante interacción directa con el ADN y cuya finalidad es la de ayudar a proteger el extremo telomérico <sup>152</sup>. A ellas se unen otras muchas formando así un complejo competidor de la telomerasa que impide el acceso de la enzima (figura 10).

INTRODUCCIÓN

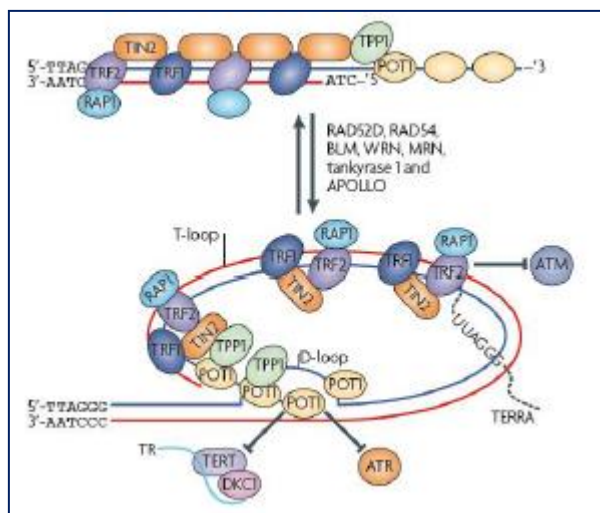


Figura 10: Extremo telomérico linealizado (parte superior) y formando el bucle (parte inferior) junto con sus proteínas asociadas <sup>153</sup>.

En las células somáticas que no poseen mecanismos de mantenimiento de la longitud telomérica en cada replicación, y consecuentemente cada división celular, se produce una pérdida de entre 100 y 200 pb de la secuencia telomérica. Esto es debido a la ausencia de polimerasas capaces de replicar la cadena de ADN completa, ya que siempre queda en el extremo 5' el hueco correspondiente al fragmento de Okazaki. De esta forma, después de un número de divisiones determinado (entre 40 y 70), la longitud telomérica llega a ser crítica (2.5 kb) y se alcanza el punto de Hayflick. En ese momento, el cromosoma pierde su protección y las células entran en estado de senescencia en el que, aun siendo metabólicamente activas y viables, no proliferan <sup>154</sup>. Se trata de un mecanismo irreversible que se acompaña de cambios morfológicos y de la expresión génica y que desemboca finalmente en la apoptosis celular, contribuyendo, por tanto, al envejecimiento del organismo <sup>155</sup>.

En las células germinales <sup>156</sup> y tejidos en desarrollo <sup>157</sup> existe un mecanismo de replicación de telómeros: la telomerasa. Se ha comprobado que también está presente en células endometriales <sup>158</sup>, en la capa basal de la epidermis <sup>159</sup> y en el sistema hematopoyético <sup>160</sup>. En ciertas células del organismo el mecanismo de la telomerasa puede ser inducido durante determinadas etapas de la vida, como ocurre durante la activación de los linfocitos T <sup>161,162</sup>.

En las células que poseen telomerasa, el ADN telomérico permanece en un estado de dinamismo debido a sus pérdidas y adiciones. De esta forma, la longitud telomérica se encuentra normalmente regulada y dentro de unos límites bien definidos, permaneciendo en un estado de equilibrio que se ve influenciado por factores genéticos, ambientales y fisiológicos<sup>163</sup> denominado “homeostasis telomérica”<sup>164</sup>.

La telomerasa es un complejo con tres componentes principales: la proteína de la familia de las transcriptasas inversas TERT, un ácido ribonucleico denominado TERC y la proteína auxiliar DKC1<sup>165,166</sup>.

Cuando la célula replica su material genético antes de dividirse, la telomerasa es guiada hacia los telómeros. Allí se alinea con el extremo de la hebra G y lleva a cabo su extensión. De esta forma los telómeros mantienen su longitud y mantienen la estabilidad cromosómica evitando la recombinación, la fusión entre telómeros, y la degradación del ADN.

Dentro de la población se han encontrado diferencias en la longitud de los telómeros, debido al estrés oxidativo<sup>167-169</sup>, que están asociadas con ciertos polimorfismos genéticos<sup>170</sup>.

Si nos centramos en la catarata, existen diferentes estudios sobre la longitud telomérica, realizados a nivel de las células del cristalino en animales<sup>167-169,171</sup> y en los leucocitos de sangre periférica<sup>172,173</sup> donde se demuestra una relación entre un acortamiento de los telómeros y la aparición de la catarata.

Son varios los estudios que defienden una estrecha asociación entre la medida de longitud telomérica de los leucocitos y el proceso de envejecimiento del organismo a distintos niveles (cristalino, sistema cardiovascular, demencia..) <sup>172-175</sup>. Por tanto, el desarrollo de la catarata podría ser considerado un buen marcador, fácil y poco invasivo de evaluar, que ayudaría a definir un envejecimiento prematuro en la persona<sup>173</sup>.

El estrés oxidativo sería un punto clave a la hora de inducir una senescencia prematura de las células del cristalino dañando el ADN, acortando los telómeros y reduciendo la actividad de la telomerasa en mamíferos (en humanos no se ha demostrado actividad

de la telomerasa a nivel del cristalino). El mecanismo molecular por el cual los radicales libres dañan las células del cristalino, sería el resultado de una peroxidación a nivel biomolecular y de las membranas celulares producida por la falta de detoxificación de los fosfolípidos hidroperoxidados <sup>167-169</sup>.

El estrés oxidativo y la radiación no ionizante en forma de UVA producen rupturas en la hebra del ADN, directamente o en un paso intermedio en la reparación de la oxidación en bases modificadas. El tADN, a diferencia de genómico, presenta una cierta incompetencia para la reparación de dichas rupturas conllevando esto, a un acúmulo telomérico a nivel celular durante las fases G0 y G1. Este proceso junto con la ausencia de actividad de la telomerasa, conduce a un acortamiento crítico de los telómeros y consecuentemente a cambios dramáticos en el fenotipo celular y que la célula entre en senescencia <sup>167-169,174</sup>.

Existen además algunos factores de riesgo que van a condicionar un mayor acortamiento de la longitud telomérica como son:

- *Factores de riesgo cardiovasculares:* diabetes, HTA y tabaco <sup>173-177</sup>.

- *Factores demográficos:*

- Edad: supone el factor más importante en relación al envejecimiento celular y por tanto está íntimamente ligado con una disminución en la longitud telomérica.
- Sexo: las mujeres poseen telómeros más largos que los hombres para una misma edad, pese que al nacimiento su longitud es idéntica <sup>171,175,178</sup>.

- *Factores relacionados con el estilo de vida:* obesidad, dieta e inactividad física <sup>172,175, 179,180</sup>.

- *Factores relacionados con la variabilidad inter individual que condicionan la aparición de polimorfismos de la telomerasa:* TERT-1327C>T (rs2735940) y TERC-63G>A (rs2293607). Ambos polimorfismos se han visto asociados a un acortamiento telomérico, debido a una menor actividad de la telomerasa que conlleva una ralentización del alargamiento de los telómeros <sup>170,181</sup>. Concretamente el genotipo C/T

INTRODUCCIÓN

de TERT-1327C>T y el alelo G en TERC-63G>A han sido descritos como factores asociados a telómeros más cortos en sangre periférica.

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---





Las cataratas seniles son responsables de prácticamente la mitad de las cegueras existentes en el mundo <sup>182</sup> y el único tratamiento en la actualidad es el quirúrgico. El incremento de la esperanza de vida de la población ha provocado un aumento de la prevalencia de las cataratas.

El envejecimiento se asocia con acortamiento telomérico y existen algunas series publicadas <sup>172-175</sup> donde se muestra una asociación entre el tamaño menor de los telómeros a nivel de las células blancas de la sangre periférica y la aparición de cataratas, pero dicha relación aún no ha sido estudiada en pacientes jóvenes que desarrollan cataratas preseniles.

Debido a la importancia de dicha enfermedad y a la escasez de estudios al respecto, hemos decidido analizar la asociación entre la longitud telomérica y la aparición de cataratas diferentes grupos de edad, prestando especial atención a los pacientes jóvenes que presentan cataratas y en la selección de la muestra, para evitar que factores de riesgo que por sí solos acortan los telómeros puedan interferir en nuestros resultados.

Así, establecemos como hipótesis y objetivos de nuestro estudio lo siguiente:

## **1. HIPÓTESIS**

La catarata es una opacidad del cristalino, producida por el proceso degenerativo asociado a la edad. Es bien conocido que el envejecimiento se asocia con acortamiento telomérico, por lo tanto, sería razonable esperar un mayor acortamiento telomérico en los leucocitos de la sangre periférica en pacientes con cataratas respecto a individuos sin esta patología, sobre todo en pacientes jóvenes con cataratas los cuales presentarían un envejecimiento precoz.

## 2. OBJETIVOS

- Primer objetivo: Medir la longitud telomérica en los leucocitos de sangre periférica en sujetos diagnosticados de cataratas a diferentes edades y en una cohorte de individuos sin cataratas.
- Segundo objetivo: Analizar la posible relación entre el acortamiento telomérico y la presencia de factores de riesgo, como son la HTA, la DM, el sexo, y el hábito tabáquico.
- Tercer objetivo: Estudiar la distribución de ciertos polimorfismos de la telomerasa en relación con la predisposición a padecer cataratas en pacientes con cataratas y en sujetos sin este proceso degenerativo, ya que dichos polimorfismos se asocian con una menor actividad de la telomerasa y su consecuente ralentización en el alargamiento de los telómeros<sup>170,181</sup>:
  - TERT-1327C>T (rs2735940)
  - TERC-63G>A (rs2293607)

# PACIENTES Y MÉTODOS

---



## **1. PACIENTES**

La elección de los individuos, tanto de casos como de controles, se lleva a cabo en el Hospital Clínico de Salamanca, entre los pacientes que acuden a consulta de oftalmología durante el periodo comprendido entre junio de 2012 a enero de 2014. Se les extrae una muestra de sangre periférica, que posteriormente es enviada al laboratorio del IBSAL para la obtención del ADN. Previamente deben firmar el consentimiento informado (anexo1) siguiendo las normas legales para Estudios Clínicos en España y las del Comité de Ética del Hospital Universitario de Salamanca.

Los pacientes considerados como casos han sido intervenidos de cataratas en el servicio de Oftalmología del Hospital Clínico Universitario de Salamanca desde el 1 de julio de 2012 hasta el 1 de enero de 2014.

Realizamos un estudio analítico retrospectivo observacional en el cual se han seleccionado 205 pacientes, hombres y mujeres, de raza caucásica divididos primeramente en dos grupos: casos y controles en función de la presencia o ausencia de catarata, y a su vez cada grupo lo dividimos según su edad en menores de 55 años y mayores de 60 años. Se establecen estas edades como punto de división de la muestra al considerarse los pacientes menores de 55 años activos laboralmente y con una edad temprana para el desarrollo de cataratas, si los comparamos con la edad promedio de aparición en la población global (mayores de 61)<sup>48,51,93</sup>. Nos acogemos por tanto, a la clasificación clínica de cataratas para dividir nuestra muestra en grupos de edad, considerando cataratas preseniles aquellas presentes en pacientes menores de 55 años y seniles las que aparecen en mayores de 60 años. Hemos obviado un tramo de edad de 56 a 59 años con el fin de crear un intervalo que constate una mayor diferenciación entre grupos.

A todos los pacientes se les realiza una anamnesis y exploración en la consulta de oftalmología consistente en:

### **1.- Recogida de datos:**

- Datos demográficos: edad, sexo y lugar de residencia. Toda la población estudiada era urbana, pertenecía a Salamanca y alrededores, por lo que la exposición a radiación UVA no había sido elevada.

- Factores de riesgo para el desarrollo de cataratas: posibles enfermedades asociadas (HTA o diabetes), antecedentes de hábitos tóxicos como el tabaco (consumo de tabaco de por lo menos 10 cigarrillos al día durante al menos 5 años) o el alcohol (dos unidades de alcohol /día en mujeres y tres unidades de alcohol/día en hombre, siendo cada unidad de alcohol equivalente a una media de 8 grs.) o ingesta de drogas, tratamientos sistémicos y oculares actuales y pasados o intervenciones quirúrgicas oftalmológicas.

### **2.- Exploración oftalmológica:**

- Medida de la refracción y queratometría para el cálculo de la potencia de la lente intraocular (LIO) mediante el auto-refractómetro modelo KR 8800 marca Topcon.

- Medida de la PIO neumática con el CT 80 computerized tonometer marca Topcon.

- Medida de la agudeza visual (AV) de cada uno de los ojos según la escala de la ETDRS, a una distancia de 5 metros corrigiendo los defectos refractivos mediante graduación.

- Biomicroscopía en lámpara de hendidura:

a) Exploración de la amplitud de la cámara anterior del paciente previo a la midriasis.

b) Exploración de la presencia y grado de madurez de las cataratas bajo midriasis. Por transiluminación y aplicando la clasificación de cataratas LOCS tipo III<sup>31,32</sup> determinamos la presencia, grado de madurez y opacidad de las mismas. En este sistema se emplean tres series de fotografías, una para graduar la opacidad y opalescencia nuclear, otra para evaluar las cataratas corticales y una tercera para medir las cataratas subcapsulares posteriores. Las dos últimas series de imágenes son tomadas por retroiluminación en la lámpara de hendidura.

Así, en función de estas instantáneas, podemos clasificar las cataratas según la gradación que presente, descrita en la introducción de este trabajo.

- Oftalmoscopia indirecta: Se lleva a cabo un estudio del fondo de ojo de todos los pacientes para descartar patologías asociadas. Se emplea la lámpara de hendidura con lente de 90 dioptrías o el oftalmoscopio indirecto binocular, utilizando una lente de 20 dioptrías.
- Biometría ultrasónica de contacto (DGH 5100 IOL Computer Module): En los pacientes que presentan cataratas con criterios quirúrgicos, previa a la cirugía, es necesaria la medición de la LIO que sustituirá al cristalino tras la intervención por facoemulsificación.

### **3.- Criterios de selección de pacientes**

El grupo de pacientes está formado por personas con catarata que cumplen criterios de intervención quirúrgica. La AV por debajo de la cual se incluye al paciente en la lista de espera para cirugía de catarata es de 0.5 o aquella que interfiera en la realización de sus actividades diaria, una vez descartada cualquier otra patología oftalmológica que pueda cursar con disminución de AV.

El grupo de controles está constituido por sujetos con AV mejor corregida de la unidad en ausencia de opacidad cortical o subcapsular, y admitiendo un grado de opacidad nuclear máximo de NO1, utilizando la clasificación LOCS tipo III.

Los pacientes de ambos grupos presentan una similitud de criterios de selección en cuanto a edad, sexo, procedencia (área metropolitana) y factores de riesgo estudiados (HTA, DM y tabaquismo).

Se excluyeron del estudio:

- Pacientes en tratamiento actual o previo con corticoides sistémicos.
- Pacientes con hábito enólico o a otras sustancias tóxicas.
- Pacientes con traumatismos oculares, antecedentes de inflamación intraocular o cirugía vítreo-retiniana.

- Pacientes con enfermedades sistémicas que han demostrado su asociación con la aparición de cataratas (el síndrome de Steiner, el síndrome de Down o las enfermedades por depósito...etc).

## **2. MÉTODOS**

### **2.1 AISLAMIENTO DEL ADN DE ALTO PESO MOLECULAR**

#### **2.1.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA**

Las muestras de sangre periférica se obtienen por venopunción antecubital, previa firma del consentimiento informado por parte del paciente (anexo1). Se recogen 10 ml de sangre en tubos con EDTA y se conservan a 4 °C hasta su procesamiento.

#### **2.1.2 OBTENCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEADAS DE SANGRE PERIFÉRICA**

Las células nucleadas de la sangre se aíslan mediante centrifugación repetida y lisis eritrocitaria con solución hipotónica (centrifugación de la sangre total en 50ml de agua bidestilada (ddH<sub>2</sub>O) durante 30 minutos, 1500 rpm, a 4°C).

Tras la recuperación de la interfase, las células mononucleadas se lavan en tampón Fornace (0.25M Sacarosa; 50 mM Tris-HCL pH 7.5; 25mM KCL; 5mM MgCl<sub>2</sub>; el tampón Fornace da la osmolaridad necesaria para no romper los leucocitos) y se precipitan mediante centrifugación a 580 rpm durante 20 minutos. El botón de células nucleadas de la sangre se resuspende de nuevo en tampón Fornace a una concentración estimada de 5x10<sup>6</sup> células/ml.

#### **2.1.3 AISLAMIENTO DEL ADN TOTAL DE ALTO PESO MOLECULAR**

A la muestra obtenida en el paso anterior se añade EDTA (ácido etilendiaminotetraacético, concentración final 10 mM), SDS (Dodecil sulfato sódico,



concentración final 1%) y Proteinasa K (Boehringer Mannheim, concentración final 50 µg/ml). Esta mezcla se incubaba 55°C durante 8-16 h.

#### 2.1.4 PURIFICACIÓN DEL ADN

Tras la incubación anterior se purifica el ADN mediante extracción con fenol-CIAA (cloroformo/alcohol isoamílico 24:1 v/v), y se centrifuga durante 10 minutos a 1800 rpm.

Se recupera la fase acuosa sobrenadante superior (contiene el ADN en solución) evitando la interfase proteica, y se añade el mismo volumen obtenido de fenol-CIAA.

Posteriormente se centrifuga a 1800 rpm durante 10 minutos.

Una vez recuperada de nuevo la fase acuosa, el ADN en solución se precipita mediante la adición de 2,5 volúmenes de etanol absoluto al 100% frío (-20°C). El ADN extraído se lava con etanol al 70% y, tras una breve centrifugación a 16600 rpm, se deja evaporar el etanol residual y se disuelve el ADN en tampón TE (Tris-HCl 10mM pH 7,5; EDTA 1mM) o en agua destilada.

#### 2.1.5 CUANTIFICACIÓN DEL ADN

La concentración y el grado de contaminación proteica del ADN así obtenido, se calculan tras medir su absorbancia a 260 y 280 nm respectivamente, en un espectrofotómetro (GeneQuant, Pharmacia) por medio de la siguiente fórmula:

$$\mu\text{gde ADN/ml} = (\text{D.O. 260}) \times (\text{factor de dilución}) \times (50)$$

D.O.: densidad óptica

50 es un factor de corrección introducido, ya que una unidad de densidad óptica con una luz incidente de 260 nm es el valor de absorbancia que tienen 50 µg de ADN/ml.

El cociente D.O.260/D.O.280 se utiliza para determinar el grado de contaminación proteica, considerando como valores adecuados un cociente entre 1.65 y 2.0. Valores inferiores a los señalados indican contaminación por proteínas o por solventes

orgánicos, realizándose en estos casos una nueva purificación del ADN. Valores superiores indican un exceso de ARN, el cual se elimina tratando la solución de ADN con RNasa y purificando nuevamente según el método antes descrito.

La muestra de ADN con una concentración aproximada entre 1.000 y 1.500 µg/ml, se almacena en tubos Eppendorf® a -20°C, con el fin de evitar tanto la degradación progresiva del ADN como su posible contaminación por microorganismos.

## 2.2 DISCRIMINACIÓN ALÉLICA DE POLIMORFISMOS MEDIANTE PCR CON SONDAS TAQMAN®

Todas las reacciones de amplificación se llevan a cabo en un termociclador automático y la manipulación post-reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realiza en un laboratorio distinto al de la extracción del ADN y preparación de la reacción de amplificación.

En la PCR con sondas Taqman®, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior.

Además, mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación.

Los termocicladores para llevar a cabo la PCR con sondas Taqman® incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realice la amplificación.

Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en la PCR con sondas Taqman® pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos.

Para la discriminación alélica empleamos sondas específicas marcadas con fluorocromos:

Un donador en el extremo 5', que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3', que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Para que esto ocurra, las moléculas donadora y aceptora deben estar espacialmente próximas. Además, el espectro de emisión de la primera se ha de solapar con el espectro de absorción de la segunda.

En los ensayos de discriminación alélica realizados para este estudio, los fluorocromos utilizados para el reconocimiento de cada alelo han sido VIC y FAM (tabla 2).

*Tabla 2: Espectros de excitación y emisión de las sondas VIC y FAM utilizadas para PCR a tiempo real.*

Sonda	Espectro de excitación (nm)	Espectro de emisión(nm)
<b>VIC</b>	528	546
<b>FAM</b>	492	515

Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor. Sin embargo, durante la amplificación del ADN diana, la sonda se hibrida con su cadena complementaria. Al desplazarse a lo largo de la cadena en su acción de síntesis, la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*, que tiene actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donador. Como donador y aceptor están, espacialmente alejados, la fluorescencia emitida por el primero es captada por el lector (figura 11).

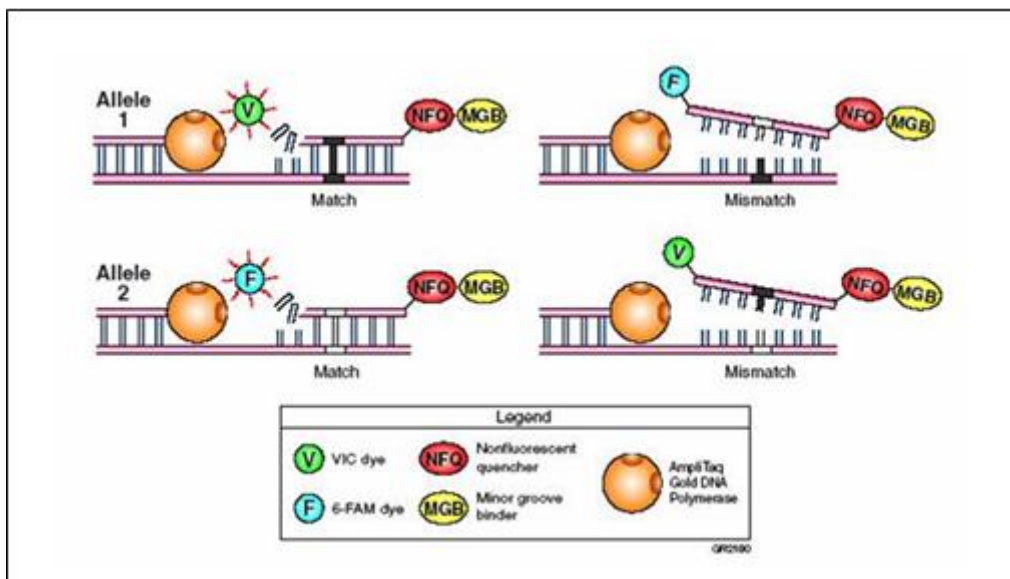


Figura 11: Mecanismo de la PCR con sondas Taqman®.

El incremento de ADN en cada ciclo se corresponde con un aumento de hibridación de las sondas, lo que conlleva un aumento en la misma proporción de fluorescencia emitida.

El empleo de estas sondas garantiza la especificidad de la detección y permite identificar polimorfismos o mutaciones puntuales.

Realizamos nuestro estudio en un termociclador de Applied Biosystems® que dispone de varios canales de lectura y permite detectar la emisión de distintos fluorocromos a la vez.

De esa manera, se pueden usar varias sondas marcadas con distintos fluorocromos, para identificar los diferentes alelos descritos en cada uno de los genes estudiados (figura 12).

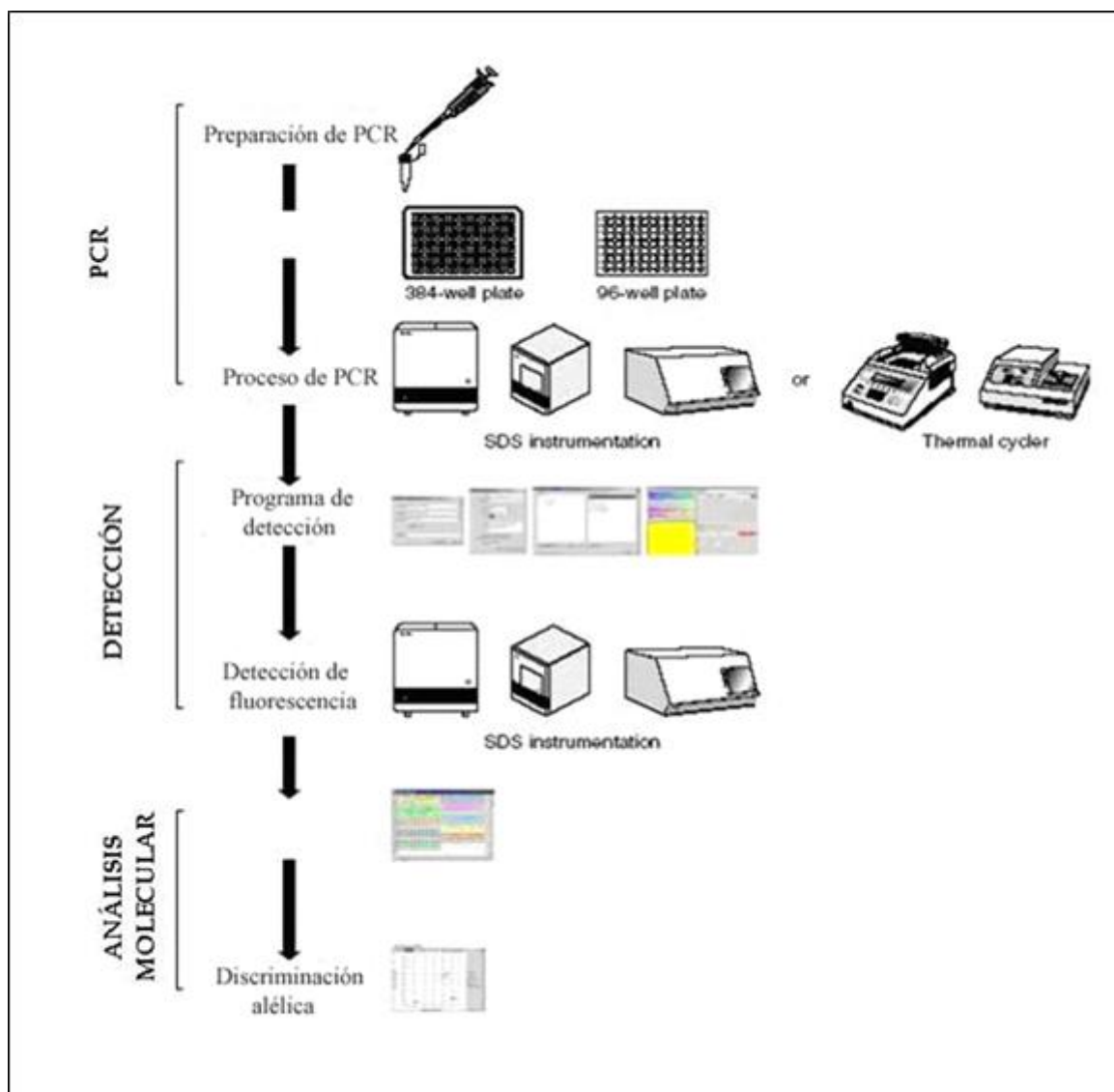


Figura 12: Discriminación alélica mediante PCR con sondas Taqman

La reacción de amplificación se lleva a cabo en el termociclador automático (Biosystem Step one®), siguiendo el mismo esquema para los distintos SNP's:

a) Realización del sustrato:

Se realiza una placa de 96 celdas, en la que ponemos como sustrato en cada una de ellas:

- 5 µl del compuesto comercial PCR Taqman®, que proporciona la enzima necesaria para la amplificación (polimerasa Taq)

- 0,25 µl del compuesto comercial que contiene oligonucleótido cebador primer “forward”, oligonucleótido cebador primer “reverse” y las sondas marcadas con fluorocromo de VIC y FAM
- 4,25 µl de agua destilada.
- 0,5 µl = 5 ng de ADN (concentración = 10-20 µg/ml).

Como control se rellenan ocho celdillas de cada placa con el mismo sustrato, pero sin ADN.

**b) Fases del programa:**

Se coloca la placa realizada en el step one<sup>®</sup> de applied biosystems<sup>®</sup> en el que nuestras muestras pasan por las siguientes fases (figura 13):

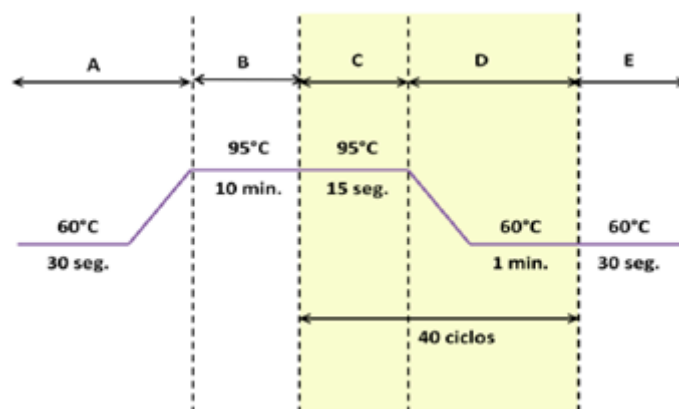


Figura 13: Esquema representativo del programa del termociclador para la realización del genotipado de los polimorfismos TERT-1327C>T y TERC-63G>A mediante PCR a tiempo real, donde B es el tiempo de desnaturalización previa, C es el tramo de desnaturalización y anillamiento de los oligonucleótidos y las sonda y D el de elongación. C y D se repiten 40 ciclos. E es el tiempo de extensión final. Se incluyen las respectivas temperaturas de cada tramo.

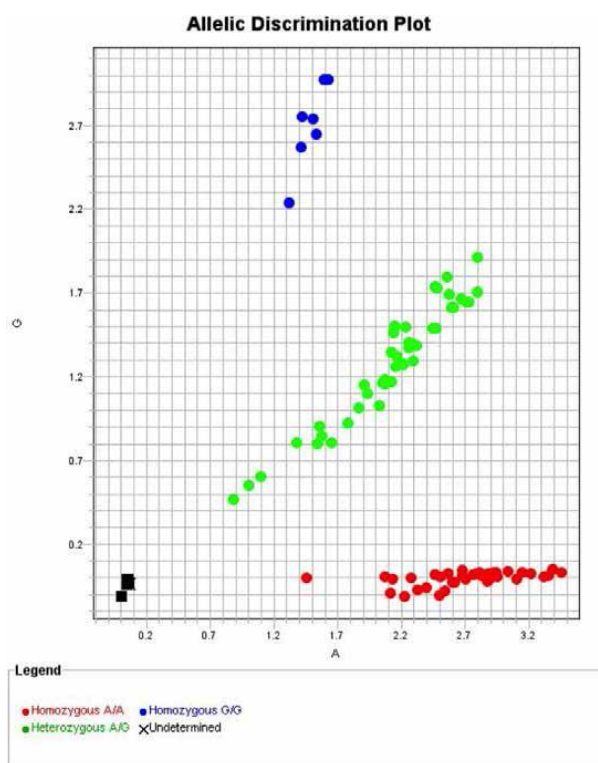
Las secuencias de las sondas utilizadas se detallan a continuación (tabla 3):

Tabla 3: Secuencia de las sondas VIC y FAM en dirección (5'-3') utilizadas para el genotipado de los polimorfismos TERT-1327C>T y TERC-63G>A mediante PCR a tiempo real.

Polimorfismo	Código comercial	Secuencia 5'-3' (VIC/FAM)
TERT 1327C>T (rs2735340)	C_1839086_10	TCGTCTTGTAATACTTAGGATTAC(A/G)GGTCGCTCTCTAGAAATCCCCTTA
TERC 63 G>A (rs2293607)	C_16184740_10	AGGTTTGGGGGTTTACACAAGCCCCCA(C/T)TGCCGGCGAGGGGTGACGGATGCHC

c) Análisis:

Se realiza un análisis de la detección de fluoresceína que nos ofrece una representación gráfica que muestra los resultados de la discriminación alélica realizada y su distribución en nuestros tres grupos de estudio (figura 14).



*Figura 14: Gráfica resultante en la técnica del genotipado en la que cada nube de puntos representa a un genotipo: los dos tipos de homocigotos en los extremos y los heterocigotos en el centro.*

## 2.3 ESTUDIO DE LA LONGITUD DE TELÓMEROS MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL CUANTITATIVA COMPARATIVA

Para realizar el estudio de la medida de la longitud de los telómeros se recurre a la técnica de PCR a tiempo real cuantitativa comparativa.

Esta técnica permite detectar y evaluar la progresión de la reacción de amplificación en cada uno de sus ciclos. Se fundamenta en la adaptación de un termociclador a un lector de fluorescencia que detecta la fluorescencia emitida por sondas o componentes intercalantes unidos al ADN. La monitorización de esta fluorescencia

permite analizar la cinética de la PCR en cada uno de sus ciclos, determinando el número de copias del fragmento de interés al inicio de la reacción. Este valor se puede cuantificar con gran precisión a través del ciclo umbral (Ct).

El Ct es el número de ciclos necesarios para que se produzca un aumento de fluorescencia significativo con respecto a la señal base y es inversamente proporcional a la cantidad inicial de moléculas molde.

La curva de fusión (melting) del producto es otro parámetro que sirve, en esta técnica, para la caracterización del producto amplificado por su valor de temperatura de fusión (Tm). Esta curva se obtiene al finalizar la amplificación y se produce como consecuencia del decaimiento de la señal fluorescente debido a la fusión dependiente de la temperatura del producto.

El gen de referencia utilizado como control endógeno fue de 36b4 (tamaño 64 pb y tiempo de anillamiento 60º) con los oligonucleótidos para su amplificación:

- Oligonucleótido sentido 5'-3': CAG CAA GTG GGA AGG TGT AAT CC
- Oligonucleótido antisentido: 5'-3' CCC ATT CTA TCA TCA ACG GGT ACA A

La fluorescencia captada por el lector en las PCRs de 36b4 debe ser la misma para todas las muestras ya que se parte de la misma cantidad de ADN en cada una de ellas (el mismo Ct). Sin embargo, la fluorescencia captada por las PCRs de los telómeros varía de unas muestras a otras dependiendo de la cantidad de copias teloméricas iniciales.

Los oligonucleótidos para la reacción de amplificación de los telómeros se muestran a continuación (tabla 4):

*Tabla 4: Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los telómeros mediante PCR cuantitativa.*

Región	Oligonucleótido sentido 5'-3'	Oligonucleótido antisentido 5'-3'
Telómeros	GGC TTG CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT	CGG TTT GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT



Nuestras muestras son preparadas en diluciones 1:10 y todas ellas son cuantificadas en un Nanodrop® ND1000 (*Thermo Fisher Scientific, Johannesburg, Sur África*).

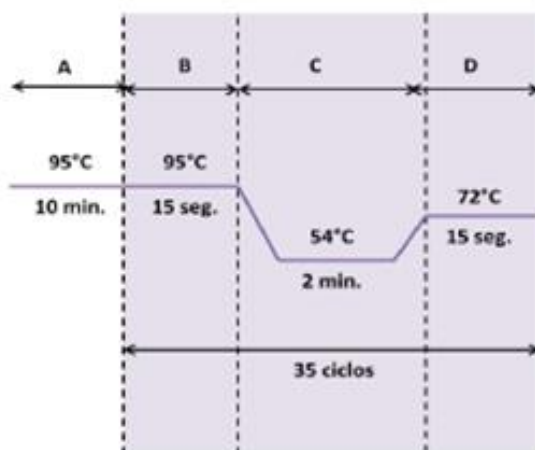
A continuación se realizan los cálculos pertinentes para dejarlas a una concentración de 5 ng/μL en un volumen de 30 μL. Una vez realizadas las diluciones se dejan las muestras encima de la superficie de trabajo durante 2 días y sólo tapada con un paño de papel. El objetivo de este paso es la evaporación del agua y secado del ADN de todas las muestras.

Una vez transcurridos los dos días, se realiza la reacción de PCR cuantitativa comparativa relativa en placas ópticas de 96 pocillos (MicroAmp® Optical 384-Well Reaction Plate With Barcode, Life Technologies-Invitrogen, California, U.S.A.). Para ello se preparan dos mezclas de reactivos cuya única diferencia fueron los oligonucleótidos y la cantidad añadida de cada uno de ellos. Cada pocillo consta de 5 μL de KapaTM Syber® Fast qPCR Kit Master Mix (2X) ABI Prism (*Kappa Biosystems, Massachusetts, U.S.A.*), 0.3 μL de oligonucleótido sentido (10 μM), 0.9 μL ó 0.5 μL de oligonucleótido antisentido (10 μM) para la reacción de amplificación de telómeros o de 36b4 respectivamente 20 ng de ADN seco (4 μL por 5 ng/μL) y ddH<sub>2</sub>O hasta completar un volumen final de 10 μL.

De cada una de las muestras se realizan tres réplicas por cada reacción de amplificación, es decir, tres réplicas para la amplificación de telómeros y tres réplicas para la reacción de amplificación del gen 36b4.

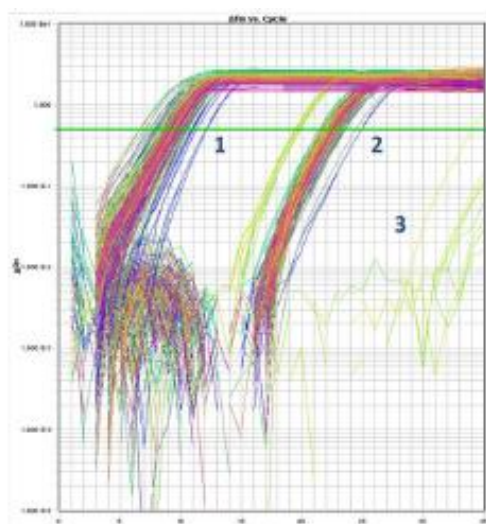
Finalmente tapamos la placa con un adhesivo óptico (MicroAmp™ Optical Adhesive Film), le aplicamos un *spin* y la dejamos reposar durante una hora a 4°C con objeto de homogeneizar las mezclas lo máximo posible.

Una vez transcurrido este tiempo se realiza la reacción de amplificación de telómeros y 36b4 en el aparato Applied Biosystems 7900HT real-time PCR (*Life Technologies-Invitrogen, California, U.S.A.*) (figura 15) utilizando el software RQ Manager software v. 1.2.



*Figura 15: Esquema representativo del programa del termociclador para la amplificación de telómeros mediante PCR cuantitativa donde A es el tiempo de desnaturalización previa y BCD son los tramos de desnaturalización, anillamiento de los oligonucleótidos y elongación que se repiten 35 ciclos. Se incluyen las respectivas temperaturas de cada tramo.*

Una vez terminado el proceso, se lleva a cabo el análisis de las amplificaciones con el mismo software que nos facilita las gráficas de amplificación y los valores de la Tm para cada una de las reacciones (figura 16).



*Figura 16: Gráficas de resultado de la amplificación de los telómeros (1), del gen 36b4 (2) mediante PCR cuantitativa y (3) de los controles negativos.*

### **3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

#### **3.1 SPSS**

El análisis estadístico se realiza con el programa informático SPSS (versión 21.0; SPSS Inc., Chicago, IL) .

Para el análisis descriptivo de los datos, se calcula la distribución de frecuencias de los porcentajes de cada categoría para cada variable cualitativa y las variables continuas se describen en términos de tendencia central (media o mediana) y de dispersión (desviación estándar).

En toda la parte descriptiva se presentan los resultados de cada variable no sólo en función de si el paciente tiene o no cataratas, sino también de acuerdo a su distribución por edad, categorizada ésta en dos grupos: menores de 55 años y mayores de 60 años.

La correlación entre edad (menores de 55 años y mayores de 60 años) y grupo (control y caso) con sexo y factores de riesgo cardiovasculares (tabaco, HTA y diabetes) se lleva cabo utilizando un análisis no paramétrico tipo U de Mann-Whitney, al no cumplir criterio de normalidad para la realización de un análisis de la varianza (ANOVA).

Para el estudio de los polimorfismos y su asociación con la longitud telomérica del leucocito (LTL) recurrimos a un modelo tipo chi cuadrado.

Se considera la existencia de significación estadística cuando hallamos un p-valor menor a 0,05.

#### **3.2 GENEX**

El análisis estadístico de la medida de la longitud telomérica se realiza con los programas StepOne software 2.1 (*Life Technologies, California, U.S.A.*) y GenEx 5.3.6 Enterprise (*MultiD Analyses AB, Göteborg, Suecia*).

El programa GenEx 5.3.6 Enterprise permite agrupar un elevado número de resultados obtenidos en diferentes placas de PCR a tiempo real cuantitativa comparativa relativa, elaborando un estudio conjunto, previa exportación de los datos desde el software StepOne al software GenEx.

GenEx es un programa adecuado para el análisis de datos de PCR cuantitativa a tiempo real comparativa relativa ya que permite realizar una corrección de las frecuencias de amplificación del fragmento a estudiar y del gen reporter. Además, normaliza las distintas réplicas de una misma muestra y a su vez normaliza todos los resultados con el ADN de referencia presente en cada placa. Todo ello teniendo en cuenta la eficiencia de nuestra PCR según los datos obtenidos en la puesta a punto de la técnica.

Finalmente, dependiendo de que nuestros datos sean paramétricos o no paramétricos, realiza un análisis estadístico de los mismos con el test adecuado hallando la significación de los datos a comparar.

Además, procedemos a la comprobación de los resultados mediante la prueba de U-Mann Whitney para muestras independientes.

# RESULTADOS

---



## 1. DATOS DEMOGRÁFICOS

### 1.1 PACIENTES

Se han estudiado un total de 205 pacientes procedentes del Servicio de Oftalmología del Hospital Clínico Universitario de Salamanca, distribuidos en dos grupos de 102 casos con cataratas y 103 controles sin cataratas. Cada grupo se ha dividido en dos subgrupos según la edad, en menores de 55 años y mayores de 60 años (figura 17):

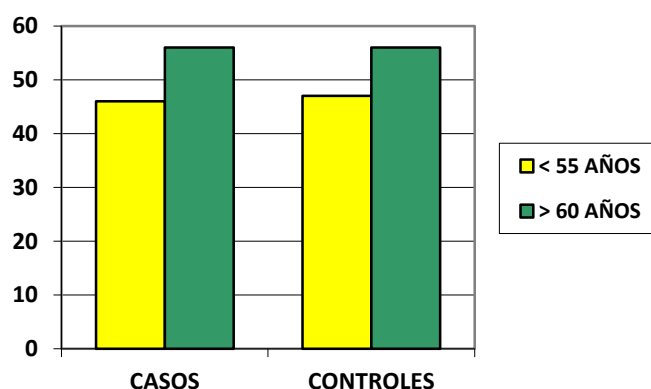


Figura 17: Distribución de la muestra en grupos.

### 1.2 SEXO

En la muestra total estudiada de sujetos con catarata y sujetos sin cataratas encontramos que 113 (52,12%) de los individuos eran mujeres y 92 (47,88%) eran hombres. La representación de porcentajes y frecuencias ateniéndonos a la clasificación en casos/controles y grupos de edad se encuentra en la tabla 5:

Tabla 5: Distribución de la muestra por sexo en los diferentes grupos.

	< 55 AÑOS		p-valor	> 60 AÑOS		p-valor	TOTAL		p-valor
	n	(%)		n	(%)		n	(%)	
CASOS									
Hombre	28	(60.9%)	0.12	25	(44.6%)	0.17	53	(52 %)	0.042
Mujer	18	(39.1%)		31	(55.4%)		49	(48 %)	
CONTROLES									
Hombre	21	(44.7%)		18	(32.1%)		39	(37.9%)	
Mujer	26	(55.3%)		38	(67.9%)		64	(62.1%)	

En el grupo total de individuos a estudio observamos una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.042$ ) en cuanto a la variable sexo, de tal manera que el porcentaje de mujeres fue mayor en nuestra muestra. Pero no hay diferencias entre los grupos de casos y controles divididos por edades. Esto podría ser justificado por una mayor asistencia de mujeres, sobre todo sin cataratas, a la consulta y por tanto un sesgo de selección a la hora de la recogida de pacientes.

### 1.3 EDAD

La edad media del conjunto de los sujetos incluidos es de 58.8 años. Se encuentra una diferencia significativa ( $p<0.01$ ) al comparar la edad de los pacientes con cataratas ( $61.6 \pm 14.1$  años) y los controles ( $56.1 \pm 12.8$  años).

Clasificados por subgrupos de edad, también hubo diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con cataratas y sin cataratas, como se muestra en la tabla 6. La dificultad a la hora de encontrar sujetos sanos que acudan a consulta y la asociación entre catarata y edad podría justificar esta diferencia entre los grupos.

*Tabla 6: Edad de los pacientes en estudio.*

	<b>CASOS &lt;55AÑOS n=46</b>	<b>CONTROLES &lt;55AÑOS n=47</b>	<b>CASOS &gt;60 AÑOS n=56</b>	<b>CONTROLES &gt;60AÑOS n=56</b>
<b>EDAD MEDIA + DE</b>	48.5 ± 7.47	43.8 ± 7.63	72.5 ± 7.6	66.5 ± 4.3
<b>MÍNIMO</b>	26	30	60	60
<b>MÁXIMO</b>	55	55	83	77
<b>p-valor</b>	<b>0.003</b>		<b>&lt;0.001</b>	

### 1.4 FACTORES DE RIESGO

En relación a los factores de riesgo estudiados implicados en la aparición de cataratas, el 36,6% de los pacientes de nuestra muestra total eran hipertensos, el 19,5% diabéticos y el 20% eran fumadores.



Analizando dichos factores en los grupos de casos y controles y en los subgrupos de edad, se observa una distribución homogénea de los mismos (tabla 7, 8 y 9). Sólo se encuentran diferencias significativas en la distribución del factor de riesgo HTA al comparar el grupo de menores de 55 años con el grupo mayores de 60 años (tabla 10), justificada por una mayor prevalencia de esta patología en relación con la edad<sup>183</sup>.

*Tabla 7: Presencia de factores de riesgo en el grupo de casos y controles.*

HTA					Diabetes mellitus			Tabaco		
		n	(%)	p-valor	n ( %)		p-valor	n ( %)		p-valor
Casos										
	SI	41	(40.2%)	0.28	20	(19.6%)	0.97	20	(19.6%)	0.89
	NO	61	(59.8%)		82	(80.4%)		82	(80.4%)	
Controles										
	SI	34	(33%)		20	(19.4%)		21	(20.4%)	
	NO	69	(67%)		83	(80.6%)		82	(79.6%)	

*Tabla 8: Presencia de factores de riesgo en el subgrupo de menores de 55 años.*

HTA				Diabetes mellitus		Tabaco	
	n	(%)	p-valor	n	(%)	n	(%)
Casos							
< 55	SI	9 (19.6%)	0.12	10 (21.7%)	0.39	11 (23.9%)	0.95
	NO	37 (80.4%)		36 (78.3%)		35 (76.1%)	
Controles							
< 55	SI	4 (8.5%)		7 (14.9%)		11 (23.4%)	
	NO	43 (91.5%)		40 (85.1%)		36 (76.6%)	

Tabla 9: Presencia de factores de riesgo en el subgrupo de mayores de 60 años.

HTA					Diabetes mellitus			Tabaco		
		n	(%)	p-valor	n	(%)	p-valor	n	(%)	p-valor
Casos										
> 60	SI	32	(57.1%)	0.7	10	(17.9%)	0.48	9	(16.1%)	0.8
	NO	24	(42.9%)		46	(82,1%)		47	(83.9%)	
Controles										
> 60	SI	30	(53.6%)		13	(23.2%)		10	(17.9%)	
	NO	26	(46.4%)		43	(76.8%)		46	(82.1%)	

Tabla 10: Presencia de factores de riesgo en el grupo de menores de 55 años y mayores de 60 años.

HTA					Diabetes mellitus			Tabaco		
		n	(%)	p-valor	n	(%)	p-valor	n	(%)	p-valor
Grupo										
< 55	SI	13	(14%)	<0.001	17	(18.3%)	0.68	22	(19.6%)	0.33
	NO	80	(86%)		76	(81.7%)		71	(80.4%)	
Grupo										
> 60	SI	62	(55.4%)		23	(20.5%)		19	(17%)	
	NO	50	(44.6%)		89	(79.5%)		93	(83%)	

## 2. ESTUDIO DE LA LONGITUD DE TELÓMEROS

La longitud de los telómeros se ha relacionado con el envejecimiento y diversos estados patológicos como la aparición de tumores<sup>184</sup>.

La longitud media relativa de los telómeros de cada paciente se muestra en el Anexo 2.

La longitud telomérica media, la desviación estándar y los p valores obtenidos al comparar los grupos de individuos de acuerdo con su edad y la presencia o no de patología (catarata) se reflejan en la tabla 11.

Todas las distribuciones en los grupos a comparar son no paramétricas y, por tanto, se aplica un test de U Mann Whitney mediante el paquete estadístico SPSS v. 21.0, para afianzar y corroborar los resultados obtenidos mediante el programa Genex.

*Tabla 11: Estudio estadístico comparativo de la longitud telomérica.*

	LONGITUD TELOMÉRICA	P-VALOR
<b>CASOS vs. CONTROLES</b>	2,88 +/-1,43 5,17 +/-1,58	P<0.01
<b>CASOS &lt; 55 AÑOS vs. CONTROLES &lt; 55 AÑOS</b>	2,36 +/-1,56 5,85 +/-1,58	P<0.01
<b>CASOS &gt; 60 AÑOS vs. CONTROLES &gt; 60 AÑOS</b>	3,30 +/-1,17 4,69 +/-1,30	P<0.01
<b>CASOS &lt; 55 AÑOS vs. CASOS &gt; 60 AÑOS</b>	2,36 +/-1,56 3,30 +/-1,17	P<0.01
<b>CONTROLES &lt; 55 AÑOS vs. CONTROLES &gt; 60 AÑOS</b>	5,85 +/-1,58 4,69 +/-1,30	P<0.01

Se observa una menor longitud telomérica en los casos respecto a los controles independientemente del factor edad. Si tenemos en cuenta la presencia de cataratas, los menores de 55 años tienen un mayor acortamiento telomérico en relación a los mayores de 60 años. Sin embargo al cotejar los controles, encontramos resultados opuestos: una mayor edad condiciona un mayor acortamiento.

## DISCUSIÓN

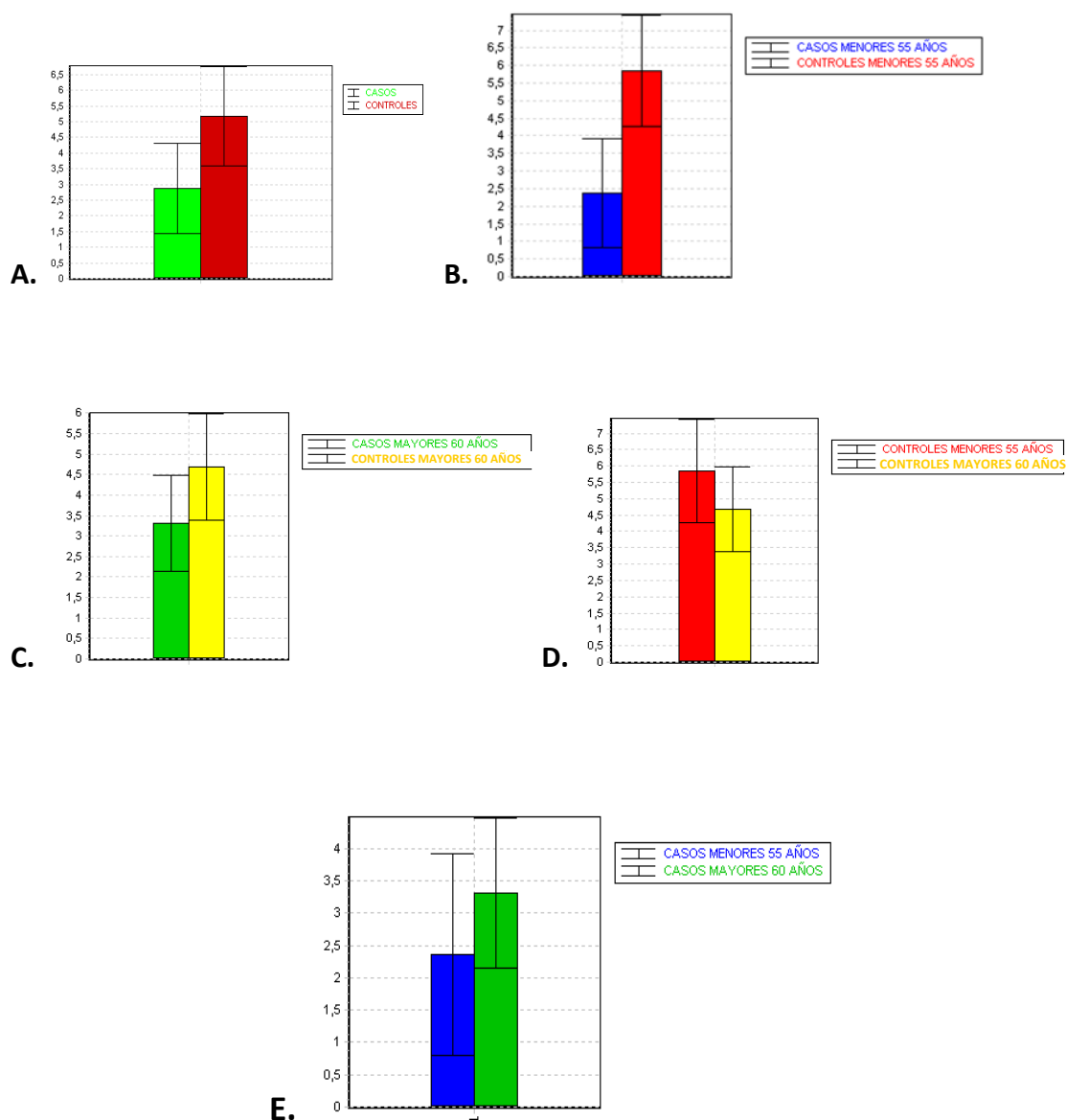


Figura 18: Representación gráfica de la longitud telomérica media en cada grupo (A: controles y casos) y en relación a su edad (B: controles y casos menores de 55 años),(C: controles y casos mayores de 60 años),(D: controles menores de 55 años y mayores de 60 años),(E: casos menores de 55 años y mayores de 60 años).

## 3. ANÁLISIS DE LOS FACTORES DE RIESGO Y LA LONGITUD TELOMÉRICA

Determinados factores como el sexo, la HTA, la DM o el tabaco pueden influir en la longitud telomérica, siendo el tabaco el que se ha sido considerado más relevante por su mayor relación con el acortamiento del telómero.

Por ello, realizamos un análisis estadístico no paramétrico tipo U Mann-Whitney para descartar la posible interferencia de estos factores sobre la LTL de los grupos de individuos a estudio.

Al evaluar los diferentes grupos y subgrupos no se encuentra una asociación significativa entre los factores estudiados y la longitud de los telómeros, excepto en el caso del consumo de tabaco donde se observa un mayor acortamiento telomérico en los casos/controles mayores de 60 años fumadores ( $p=0.047$ ) (tabla 12,13 y 14).

*Tabla 12. Análisis comparativo de la influencia de los FR sobre la LTL en casos y controles.*

FACTOR RIESGO	PRESENTE n (%)	AUSENTE n (%)	p-valor
<b>SEXO</b>	113 (55.1%) M	92 (44.9%) V	0.52
<b>HTA</b>	75 (36.6%)	130 (63.4%)	0.68
<b>DM</b>	40 (19.5%)	165 (80.5%)	0.38
<b>TABACO</b>	41 (20%)	164 (80%)	0.66

M:mujer; V:varón.

*Tabla 13: Análisis comparativo de la influencia de los FR sobre la LTL en casos y controles < 55 años.*

FACTOR RIESGO	PRESENTE n (%)	AUSENTE n (%)	p-valor
<b>SEXO</b>	44 (21.5%) M	49 (78.5%) V	0.36
<b>HTA</b>	13 (14%)	80 (86%)	0.47
<b>DM</b>	17 (18.3%)	76 (81.7%)	0.18
<b>TABACO</b>	22 (23.6%)	71 (76.3%)	0.49

M:mujer; V:varón.

Tabla 14: Análisis comparativo de la influencia de los FR sobre la LTL en casos y controles > 60 años.

FACTOR RIESGO	PRESENTE n (%)	AUSENTE n (%)	p-valor
SEXO	69 (61.6%)M	43 (38.4%)V	0.89
HTA	62 (55.4%)	50 (44.6%)	0.9
DM	23 (20.5%)	89 (79.5%)	0.65
TABACO	19 (17%)	93 (83%)	<b>0.047</b>

M:mujer; V:varón.

#### 4. ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS TERT-1327C>T Y TERC-63G>A.

Los polimorfismos -1327C>T y -63G>A se localizan en las regiones 5'-UTR de las subunidades de la telomerasa TERT y TERC respectivamente. Ambos han sido relacionados con una baja actividad de la telomerasa y, por tanto, con un acortamiento telomérico prematuro<sup>170,181</sup>.

La mutación recesiva, y por tanto la menos frecuente, de dichos polimorfismo (sustitución de T por C en caso de TERT o de A por G en TERC) está asociada a un mayor acortamiento del telómero.

Decidimos analizar los dos polimorfismos mediante análisis de genotipado por PCR a tiempo real con sondas TaqMan® a fin de estudiar si existía una correlación entre aquellos grupos con telómeros más cortos y la presencia del alelo recesivo C en el caso de TERT-1327C>T o el alelo G en el de TERC-63G>A. Los resultados del genotipado para cada paciente se muestran en el anexo 2. En las tablas 15,16 y 17 se presentan las frecuencias de aparición de cada uno de los genotipos para cada polimorfismo

estudiado así como la codominancia. La distribución genotípica de ambos polimorfismos se encuentra dentro del equilibrio de Hardy-Weinberg en casos y controles.

*Tabla 15: Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2735940 del gen TERT y del polimorfismo rs2293607 del gen TERC en casos y controles.*

SNP	Genotipo	Casos n (%)	Controles n (%)	p-valor
<b>TERT rs2735940</b>	TT	31 (3.4%)	26 (25.2%)	0.7
	TC	54 (52.9%)	58 (56.3%)	
	CC	17 (16.7%)	19 (18.4%)	
	TT	31 (3.4%)	26 (25.2%)	0.44
	TC+CC	71 (69.9%)	77 (74.8%)	
	TT+TC	85 (83.3%)	84 (81.55%)	0.44
	CC	17 (16.7%)	19 (18.4%)	
<b>TERC rs2293607</b>	AA	60 (58.8%)	69 (67.7%)	0.38
	AG	38 (37.3%)	29 (28.2%)	
	GG	4 (3.9%)	5 (4.9%)	
	AA	60 (58.8%)	69 (67%)	0.25
	AG+GG	42 (41.2%)	34 (33%)	
	AG+AA	98 (96.1%)	98 (95.1%)	1
	GG	4 (3.9%)	5 (4.9%)	

Tabla 16: Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2735940 del gen TERT y del polimorfismo rs2293607 del gen TERC en casos y controles < 55 años.

SNP	Genotipo	Casos< 55 n (%)	Controles< 55 n (%)	p-valor
<b>TERT rs2735940</b>	TT	14 (30.4%)	12 (25.5%)	0.07
	TC	21 (45.7%)	31 (66%)	
	CC	11 (23.9%)	4 (8.5%)	
	TT	14 (30.4%)	12 (25.5%)	0.65
	TC+CC	32 (69.6%)	35 (74.5%)	
	TC+TT	35 (76.1%)	43 (91.5%)	0.052
	CC	11 (23.9%)	4 (8.5%)	
<b>TERC rs2293607</b>	AA	27 (58.7%)	33 (70.2%)	0.22
	AG	18 (39.1%)	11 (23.4%)	
	GG	1 (2.2%)	3 (6.4%)	
	AA	27 (58.7%)	33 (70.2%)	0.28
	AG+GG	19 (41.3%)	14 (29.8%)	
	AG+AA	45 (3.9%)	44 (4.9%)	0.62
	GG	1 (2.2%)	3 (6.4%)	



Tabla 17: Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2735940 del gen TERT y del polimorfismo rs2293607 del gen TERC en casos y controles > 60 años.

SNP	Genotipo	Casos> 60 n (%)	Controles> 60 n (%)	p-valor
<b>TERT rs2735940</b>	TT	17 (30.4%)	14 (25.0%)	0.11
	TC	33 (58.9%)	27 (48.2%)	
	CC	6 (10.7%)	15 (26.8%)	
	TT	17 (30.4%)	14 (25%)	0.67
	TC+CC	39 (69.9%)	42 (75%)	
	TC+TT	50 (89.3%)	41 (73.2%)	0.051
	CC	6 (10.7%)	15 (26.8%)	
<b>TERC rs2293607</b>	AA	33 (58.9%)	36 (64.3%)	0.8
	AG	20 (35.7%)	18 (32.1%)	
	GG	3 (5.4%)	2 (3,6%)	
	AA	33 (58.9%)	36 (64.3%)	0.69
	AG+GG	23 (41.1%)	20 (35.7%)	
	AG+AA	53 (94.6%)	54 (96.4%)	1
	GG	3 (5.4%)	2 (3.6%)	

No se encuentran diferencias estadísticamente significativas en la distribución genotípica o alélica de los polimorfismos al comparar el grupo de casos con el de controles, ni tampoco entre los distintos subgrupos clasificados por edad, siendo más frecuente el genotipo CC del rs2735940 en los pacientes con cataratas mayores de 60 años con respecto a los controles, aunque dicha diferencia no ha alcanzado la significación estadística ( $p = 0,052$ ).

Tabla 18: Distribución de los genotipos del polimorfismo rs2735940 del gen TERT y del polimorfismo rs2293607 del gen TERC en casos < 55 años y casos > 60 años.

SNP	Genotipo	Casos <55 n (%)	Casos >60 n (%)	p-valor
<b>TERT rs2735940</b>	TT	14 (30.4%)	17 (30.4%)	0.18
	TC	21 (4.7%)	33 (58.9%)	
	CC	11 (23.9%)	6 (10.7%)	
	TT	14 (30.4%)	17 (30.4%)	1
	TC+CC	32 (69.6%)	39 (69.6%)	
	TT+TC	35 (76.1%)	50 (89.3%)	0.65
	CC	11 (23.9%)	6 (10.7%)	
<b>TERC rs2293607</b>	AA	27 (58.7%)	33 (58.9%)	0.73
	AG	18 (39.1%)	20 (35.7%)	
	GG	1 (2.2%)	3 (5.4%)	
	AA	27 (58.7%)	33 (58.9%)	1
	AG+GG	19 (41.3%)	23 (41.1%)	
	AG+AA	45 (97.8%)	53 (94.6%)	0.62
	GG	1 (2.2%)	3 (5.4%)	

## DISCUSIÓN

---



La catarata, actualmente la causa más frecuente de ceguera en el mundo, es una patología altamente invalidante, especialmente cuando aparece en pacientes jóvenes en los que puede llegar a afectar a su actividad laboral. El desarrollo de la catarata está asociado con el proceso de envejecimiento. Por ello, ante el progresivo aumento de la vida media de la población en las sociedades occidentales, esta entidad clínica se convierte en un relevante motivo de consulta oftalmológica. Representa la causa más prevalente de cirugía en las personas mayores en países desarrollados.

Pese a que la cirugía de la catarata es una técnica efectiva, la investigación de los factores etiológicos y mecanismos fisiopatológicos implicados en su desarrollo permite conocer aspectos a tener en cuenta a la hora de prevenir o retrasar su formación <sup>20,185</sup>.

Entre los factores actualmente aceptados como responsables del desarrollo de cataratas están: la edad, el tabaquismo, las radiaciones ultravioletas, la diabetes mellitus y el tratamiento con corticoides <sup>186,187</sup>.

Hasta el momento no existe ningún estudio que relacione la aparición de cataratas en pacientes jóvenes (menores de 55 años) con la longitud telomérica. En consecuencia, nos pareció interesante estudiar dicha asociación, así como los agentes que podrían influir en el acortamiento telomérico. Para ello, elegimos una muestra de pacientes con una baja presencia de los factores de riesgo que se han relacionado con el acortamiento de la longitud telomérica (HTA, DM y tabaco), pero que a su vez pudiese ser representativa de la población general, con el fin de evitar un sesgo de selección.

Los sujetos que forman parte de nuestra muestra son pacientes del Servicio de Oftalmología del Hospital Clínico Universitario de Salamanca. El grupo de pacientes con cataratas está formado exclusivamente por personas que requerían cirugía y están seleccionados de manera secuencial. No se ha estratificado por tipos de cataratas (cortical, nuclear o subcapsular), debido a que la presencia o ausencia de la enfermedad nos pareció factor suficiente a la hora de establecer una relación entre el acortamiento del telómero y la catarata. El grupo control está compuesto por

individuos del mismo rango de edad que acudieron por algún otro problema oftalmológico.

## **1. ESTUDIO DE LOS FACTORES DE RIESGO Y LA CATARATA**

Dentro del grupo de casos menores de 55 años se observa un predominio del SEXO masculino respecto al resto de grupos, donde se aprecia un aumento en el número de mujeres. Esto podría ser debido a la mayor prevalencia de cataratas en varones jóvenes y al efecto protector de los estrógenos en la mujer.

Estudios realizados en población americana (Beaver Dam Eye Study)<sup>52</sup>, francesa (The POLA Study)<sup>188</sup>, italiana (Casteldaccia Eye Study)<sup>51</sup> y sueca (Study in a Swedish Community)<sup>189</sup> concluyen que la aparición de cataratas es más frecuente en mujeres<sup>190,191</sup>.

No obstante, existen trabajos en los que se observa que la frecuencia del desarrollo de catarata puede variar dependiendo de la localización de la misma. En población australiana (The Visual Impairment Project)<sup>192</sup>, francesa (The POLA Study)<sup>188</sup> y africana<sup>193</sup> se ha descrito una mayor prevalencia de catarata cortical en mujeres<sup>190</sup>, y subcapsular posterior en hombres.

La mayor incidencia de cataratas en mujeres se ha relacionado con un factor hormonal<sup>190</sup>, pues la menarquia precoz y la menopausia tardía muestran un efecto protector, así como la incidencia de catarata nuclear disminuye en mujeres sometidas a terapia hormonal<sup>193,194</sup>. En este sentido, en el Estudio Framingham se comprueba una menor presencia de catarata nuclear y de subcapsular posterior cuanto mayor tiempo llevaban las mujeres con terapia hormonal sustitutiva<sup>195</sup>.

El posible papel protector de la terapia hormonal sería debido al efecto antioxidante de los estrógenos, aunque podría existir un sesgo en la interpretación de dicho papel al concomitar otras variables como el tabaco, el alcohol, la presión arterial sistólica alta o la diabetes que pueden actuar como factores de confusión.

Finalmente, la alimentación y el estilo de vida tendrían un papel determinante<sup>196,197</sup> en la aparición de cataratas actuando como factores de confusión.

La EDAD es la principal causa de formación de cataratas, de ahí que su aparición sea más frecuente en la población de mayor edad<sup>28,29,48,56,198</sup>. Podemos apreciar en nuestro trabajo que la media de edad es más elevada, de manera estadísticamente significativa, en los subgrupos de casos respecto a sus controles poniendo de manifiesto la gran relación entre edad y catarata. Existe por lo tanto, un sesgo de selección difícil de eliminar al ser la catarata una patología altamente asociada al envejecimiento y a la longevidad.

Diversos estudios<sup>56,185,199</sup> describen los principales efectos de la edad sobre el cristalino como son: un aumento de la dispersión de la luz por la formación de agregados proteicos insolubles, una pérdida de elasticidad cristaliniana y alteraciones en las proteínas cristalinas (cambios post-traduccionales, cambios conformacionales, pérdida de la actividad de chaperonas y de la actividad antioxidante).

La repercusión del TABACO en el desarrollo de cataratas<sup>63-66,68,97</sup> se ha mostrado en diferentes estudios. Entre ellos cabe destacar The Beaver Dam Eye Study<sup>65</sup>, Framingham I (1973-1975) y II (1986-1989)<sup>55</sup> o The Pola Study<sup>188</sup> y AREDS (Age Related Eye Disease Study) (2001), en los cuales se observa un incremento de la frecuencia de catarata nuclear en pacientes fumadores y se relaciona el riesgo de aparición con el aumento de estrés oxidativo, la disminución de antioxidantes, y el crecimiento de los niveles de cadmio que se produce en fumadores. Los análisis realizados en Maryland<sup>64</sup> o Physician's Health Study<sup>200</sup> constatan la existencia de un fenómeno acumulativo, cuanto mayor sea el consumo de tabaco, mayor es la incidencia de catarata y, una vez que se abandona el hábito tabáquico, cuantos más años pasen más se aproxima la incidencia a la del grupo de no fumadores, aunque nunca llega a igualarse. The Nurses' Health Study<sup>201</sup> dictamina que el riesgo de desarrollar cataratas se equilibra con la población no fumadora a los 10 años de dejar de fumar. Sin embargo, en The City Eye Study<sup>202</sup> no se aprecia un descenso del riesgo de opacidad nuclear en grandes

fumadores que han dejado de fumar en comparación con los pacientes que persisten con el hábito tabáquico.

En nuestra población hemos incluido un número de fumadores inferior al 24 % en los diferentes subgrupos, con la intención de recopilar una muestra representativa de la población, sin que dicho elemento interfiera como factor de confusión en nuestro estudio.

La presencia de DIABETES MELLITUS supone una mayor incidencia y progresión de la catarata en los pacientes que la padecen<sup>74</sup>. Se debe a la alteración de la enzima Aldolasa Reductasa que produce un acúmulo de sorbitol en estos enfermos, induciendo un incremento en la apoptosis y degeneración hidrópica de las células del cristalino  
72,73,75,78-81,83-86

La mayoría de los estudios realizados hasta el momento, encuentran una clara asociación entre la diabetes y el desarrollo de cataratas.

The Blue Montains Eye Study <sup>94</sup> analiza un conjunto de alteraciones metabólicas relacionadas con el aumento de resistencia a la insulina que justificarían la interacción entre diabetes y cataratas. The Beaver Dam Eye Study <sup>52,92</sup> muestra que la edad es el factor principal en la formación de catarata, actuando la diabetes como estímulo añadido para la aparición de la opacidad nuclear y cortical. En un estudio realizado en Brasil <sup>203</sup> se observa que la severidad de la retinopatía diabética se asocia con el desarrollo de cataratas en pacientes con Diabetes Mellitus tipo I. Una investigación llevada a cabo en población coreana <sup>204</sup>, describe una mayor incidencia de cataratas en diabéticos, relacionada con el tiempo de existencia de la diabetes pero no con los niveles de glucosa ni de hemoglobina glicosilada.

En nuestro trabajo se observa una incidencia de pacientes diabéticos inferior al 24 % sin clasificarlos en sujetos con diabetes tipo I o II, por lo que no podemos analizar esta variable de manera adecuada. De la misma forma que con el factor tabaco hemos evitado incluir un número importante de diabéticos en nuestra muestra, ya que



quedando demostrada la asociación entre diabetes y catarata, pretendemos evitar un sesgo en los resultados.

Varios estudios han tratado de determinar la asociación entre la presencia de HTA y el desarrollo de cataratas; sin embargo, sus mecanismos son desconocidos<sup>88</sup>.

Así, The Barbados Eye Study<sup>91</sup>, realizado en pacientes de raza negra, encuentra relación entre la hipertensión y la opacidad cortical. En cambio, el trabajo desarrollado en caucásicos americanos, The Beaver Dam Eye Study<sup>205</sup>, no encuentra asociación con la catarata, aunque sugiere que las alteraciones en fondos de ojo con hipertensión arterial se relacionan con mayor incidencia de catarata<sup>92</sup>. Sin embargo, otros estudios como el Allen Park Michigan Veterans Administration Medical Center<sup>93</sup> o The Physicians Health Study<sup>206</sup> establecen un nexo entre la catarata y la presión arterial sistólica. Por último, The Blue Montains Eye Study<sup>94</sup> compara el calibre arterial y venoso y concluye que el estrechamiento vascular no es factor de riesgo de catarata, siendo la edad el factor de riesgo real.

Si extrapolamos la medida de la HTA en nuestro trabajo, el porcentaje de pacientes con esta patología es sumamente superior en mayores de 60 años. Esto es debido a un aumento de probabilidad de padecer HTA asociado un incremento de la edad<sup>183</sup>.

Una de las teorías más recurrentes en la literatura es la relación de la LUZ ULTRAVIOLETA (UV-R) y la RADIACIÓN con la aparición de cataratas<sup>44,45,47</sup>, especialmente el subtipo cortical<sup>98</sup>. Diferentes estudios han establecido un nexo de unión entre cataratas y exposición a luz ultravioleta, y han constatado la presencia de ciertos polimorfismos en los genes reparadores del ADN<sup>207,208</sup>. La exposición a la luz ultravioleta a la que han sido sometidos nuestros sujetos se encuentra dentro de la media establecida para población metropolitana.

Los factores de riesgo son por tanto, un punto de inflexión importante a la hora de seleccionar nuestra muestra debido a su relevancia en la aparición y desarrollo de cataratas.

## **2. ANÁLISIS DE LA LONGITUD DE LOS TELÓMEROS Y LOS POLIMORFISMOS DE LA TELOMERASA EN CATARATAS**

Los telómeros son regiones de ADN no codificante situados en los extremos de los cromosomas eucariotas y formados por repeticiones en tándem de secuencias cortas de nucleótidos. Su principal función es el mantenimiento de la integridad y la estabilidad genómica<sup>163,165,209</sup>.

En cada ciclo de división celular, el mecanismo de replicación de la célula no es capaz de completar la replicación de los telómeros y se produce un acortamiento de los mismos correspondiente al fragmento de Okazaki. En las células somáticas, donde no existe un mecanismo de mantenimiento de la longitud telomérica, los telómeros se acortan hasta alcanzar un tamaño crítico (2.5 kb) en el que el cromosoma pierde su protección y las células entran en estado de senescencia muriendo finalmente por apoptosis<sup>155</sup>. Este proceso se considera un mecanismo de supresión tumoral, ya que evita la inmortalización de las células.

La telomerasa es un complejo enzimático formado por tres componentes principales: TERT con actividad transcriptasa inversa, TERC, un ácido ribonucleico y DKC1 que actúa como proteína auxiliar<sup>163,165,166</sup>. Su función principal es la de llevar a cabo el alargamiento de los telómeros en las células germinales<sup>156</sup> y en los tejidos en desarrollo<sup>157</sup>, aunque se ha comprobado que también está presente en las células endometriales<sup>158</sup>, la capa basal de la epidermis<sup>159</sup> y el sistema hematopoyético<sup>160</sup>.

En el ámbito molecular, la principal causa del acortamiento telomérico en el cristalino es el estrés oxidativo, que induce una senescencia prematura de sus células dañando el ADN y reduce la actividad de la telomerasa en mamíferos (en humanos no se ha demostrado actividad de la telomerasa en el cristalino)<sup>168,169</sup>.

Los daños secundarios al estrés oxidativo o a la radiación no ionizante en forma de UVA son difíciles de reparar a nivel del tADN, lo que conlleva una alteración en el mantenimiento de la longitud telomérica. Todo ello sumado a la ausencia de actividad

de la telomerasa en el cristalino humano, conduce a un acortamiento crítico de los telómeros y a la senescencia celular, con la consecuente formación de catarata<sup>167-169,174</sup>.

Como ya se ha mencionado, existen diversos agentes dañinos a tener en cuenta, por condicionar un mayor acortamiento de la longitud telomérica, como son determinados factores de riesgo cardiovasculares como la diabetes, HTA y tabaco<sup>172,173,175-177</sup> o factores relacionados con el estilo de vida como la obesidad, la dieta y la actividad física<sup>172,175,179,180</sup>, además de factores demográficos como la edad (el factor más importante en relación al envejecimiento celular) y el sexo. Por otra parte, las mujeres poseen telómeros más largos que los hombres para una misma edad, pese a que al nacimiento su longitud es idéntica<sup>171,175,178</sup>.

Diversas publicaciones muestran una estrecha relación entre la medida de longitud telomérica de los leucocitos y el proceso de envejecimiento del organismo a distintos niveles (cristalino, sistema cardiovascular, demencia..) <sup>172-175</sup>.

Existen diversos estudios que indican una correlación entre el acortamiento de los telómeros y la aparición de cataratas<sup>172,173</sup>. Este hecho podría llevarnos a considerar el desarrollo de la catarata como un marcador, escasamente invasivo y relativamente sencillo de evaluar, que ayudaría a definir un envejecimiento prematuro<sup>173</sup>.

Por estos motivos, en nuestro trabajo decidimos analizar la relación entre LTL y la catarata en los diferentes grupos de edad con el fin de determinar si existía una correlación entre la longitud telomérica y la enfermedad. Para ello estudiamos un grupo de individuos que presentan un bajo porcentaje de factores de riesgo, que por sí solos no afectan al tamaño del telómero con el fin de evitar sesgos, pero que a su vez es representativo de la población general, pese al pequeño tamaño muestral para una patología tan prevalente como la catarata.

Al comparar la longitud telomérica de los casos y controles, independientemente del subgrupo edad, observamos la existencia de diferencias estadísticamente

significativas, de forma que los casos presentan una longitud telomérica media menor que los controles.

Al segmentar la muestra de cada grupo por edad encontramos diferencias significativas advirtiéndose una longitud media telomérica menor en los portadores de cataratas respecto a los individuos del mismo grupo etario sin opacidad del cristalino.

Además, al comparar los dos grupos de menores de 55 años y mayores de 60 años entre sí, obtenemos diferencias estadísticamente significativas, llamando particularmente la atención el mayor acortamiento de los telómeros en casos menores de 55 años respecto a los casos mayores de 60 años. Este dato podría explicarse como consecuencia de un envejecimiento prematuro en pacientes jóvenes con cataratas, en relación con la población general.

Por tanto surge la siguiente pregunta ¿es la catarata una de las múltiples enfermedades asociadas a la senectud, fácilmente objetivable de forma temprana en pacientes jóvenes con una longitud telomérica menor a lo que corresponde por edad? La respuesta sería afirmativa según los datos obtenidos en nuestro trabajo, suscitando la posibilidad de que dichos pacientes jóvenes con cataratas requieran un mayor estudio/control de factores o enfermedades asociadas a la edad como las enfermedades cardiovasculares.

Trabajos de otros grupos refuerzan nuestra hipótesis, tanto en animales, a nivel de las células del cristalino<sup>133,167-169</sup>, como en humanos en los leucocitos de sangre periférica<sup>172,173</sup>, donde se aprecia una asociación entre el acortamiento de los telómeros y la aparición de la catarata. Sin embargo, hasta el momento, ningún estudio ha evaluado si en los pacientes jóvenes (< 55 años) que desarrollan cataratas existe una variación del tamaño del telómero en relación con la población sana.

En nuestro trabajo, los casos jóvenes con cataratas presentan un acortamiento telomérico mayor respecto a cualquiera de los subgrupos analizados, divididos por edad o por presencia/ausencia de enfermedad. Este aspecto es de especial relevancia, debido a la información que podría aportar sobre el estado de los telómeros en dichos

individuos jóvenes y el posible desarrollo de enfermedades asociadas al envejecimiento. La catarata sería además, como hemos relatado precedentemente, evaluable de manera sencilla y no invasiva.

Pese a la inclusión en nuestro trabajo de un porcentaje reducido, pero representativo de la población, de factores de riesgo hemos encontrado una significación estadística en el grupo de casos/controles mayores de 60 años entre la LTL y el tabaquismo. Este aspecto podría ser explicado por el papel que juega el tabaco en el acortamiento telomérico, sumado a su efecto acumulativo, anteriormente descrito, en la muestra de pacientes de más edad con un hábito de mayor duración. El resto de factores estudiados no han modificado de manera significativa la longitud de los telómeros en nuestra muestra.

Existen otros factores a considerar relacionados con la variabilidad inter individual que condiciona la aparición de polimorfismos de la telomerasa: TERT-1327C>T (rs2735940) y TERC-63G>A (rs2293607).

El ADN telomérico (tADN) se encuentra formando por dos hebras desiguales. La hebra en sentido 5'-3' se denomina hebra G debido al alto porcentaje de Guaninas contenidas mientras que la hebra 3'-5' se encuentra enriquecida en Citosinas. La hebra G en su extremo no se encuentra apareada con la otra hebra, dando lugar a un segmento monofibrilar que constituye el extremo 5' del cromosoma y adopta una estructura secundaria en forma de lazo que es estabilizada por proteínas específicas como POT1, TRF1, TRF2, TIN2, RAP1, TNKS2 o TPP1 (complejo shelterin)<sup>149-152,210,211</sup>.

Diversos estudios han analizado polimorfismos contenidos en las proteínas POT1, TNKS2, TRF1, TRF2 y TERT y su posible implicación en una menor protección de los extremos teloméricos y por tanto en una mayor degradación de los mismos. En nuestro trabajo hemos examinado dos polimorfismos asociados a un mayor acortamiento telomérico y consecuente pérdida de la estabilidad cromosómica: TERT-1327C>T y TERC-63G>A. En concreto, los alelos C y G, respectivamente, han sido relacionados con una menor actividad de la enzima telomerasa debido a una

disminución en la actividad cuando éstos están presentes <sup>170,181</sup>. En nuestro estudio analizamos las diferencias existentes en la distribución de los genotipos según la presencia o ausencia de catarata. No observando diferencias significativas en la distribución de genotipos en los polimorfismos TERT-1327C>T o TERC-63G>A para los distintos grupos.

La frecuencia de aparición del genotipo recesivo C/C para el polimorfismo TERT-1327C>T es la menor en todos los grupo y subgrupos de casos y controles estudiados. Dado que el alelo C ha sido relacionado con una menor actividad de la telomerasa, y por tanto, con telómeros más cortos, realizamos una agrupación por alelos. Cuando agrupamos los genotipos que contenían el alelo C, no observamos diferencias significativas al comparar los grupos o subgrupos de casos y controles entre sí; al igual que cuando agrupamos los genotipos que contenían el alelo T. Aunque cabe reseñar la existencia de dos resultados en los grupos menores de 55 años y mayores de 60 años cercanas a la significación estadística al analizar la codominancia recesiva para TERT-1327C>T.

La distribución de genotipos en el polimorfismo TERC-63G>A no mostró diferencias significativas. Teniendo en cuenta que alelo G ha sido asociado a una menor actividad de la telomerasa, la frecuencia de éste ha sido la menor en el grupo y subgrupo de casos y controles seguida por el genotipo A/G y finalmente, el genotipo dominante A/A es el más prevalente.

Por tanto, en nuestro análisis no hemos observado relación entre la longitud telomérica media y los polimorfismos TERT-1327C>T y TERC-63G>A. Aunque el alelo C y el alelo G se han asociado con una menor actividad de la telomerasa <sup>170</sup>.

Finalmente, sería conveniente el estudio de cambios epigenéticos en las regiones teloméricas y subteloméricas. Recientemente se ha demostrado que la metilación y la desacetilación de las histonas localizadas en dichas zonas constituyen un importante represor de la recombinación del ADN telomérico <sup>212,213</sup>. La desmetilación de las secuencias subteloméricas y teloméricas se asocian con la cromatina telomérica en un estado “abierto”, permitiendo que la telomerasa y las proteínas del complejo accedan

más fácilmente a la estructura para llevar a cabo la elongación de telómeros. De igual forma, un aumento en la acetilación favorece la conformación “abierta” y por tanto la elongación telomérica <sup>216</sup>. Teniendo en cuenta esta hipótesis y estos eventos habría que considerar el papel que ambos procesos juegan en la homeostasis del telómero.

Por otro lado, un último aspecto a considerar y de especial relevancia en la actualidad sería determinar el rol que desempeña el complejo de proteínas llamado shelterina, perteneciente al grupo de proteínas de unión a telómeros, que se adhieren al extremo final del tADN. Su núcleo está formado por seis subunidades, POT1, TRF1 y TRF2, que se unen directamente al tADN, y TIN2, TPP1 y RAP1, que cumplen otras funciones.

La función de la telomerasa depende altamente de las shelterinas. Así, una de las funciones principales de estas proteínas y en especial de la TFR1 es proteger los telómeros facilitando la transcripción, es decir, la producción de RNA telomérico. La proteína TRF1 podría ser considerada un regulador negativo de la telomerasa dependiente de la elongación telomérica <sup>214-217</sup>.

En resumen, no sólo los polimorfismos de la telomerasa influyen en su actividad, sino también otros complejos actúan modificando e inhibiendo la función de dicha enzima y por tanto condicionando la longitud del telómero.

### **3. LIMITACIONES DEL ESTUDIO**

- La diferencia interobservador para el diagnóstico de cataratas podría suponer un problema que se trató de paliar utilizando como criterio de inclusión pacientes que iban a ser intervenidos de cataratas con una AV por debajo a 0,5o aquella que interfiera en la realización de sus actividades diarias, sin otra enfermedad ocular que pudiera alterar su medición. Así mismo, para los controles estudiados, se valoró como criterio de inclusión el tener una AV mejor corregida de la unidad y una opacidad nuclear inferior o igual a NO1 sin presencia de catarata cortical o subcapsular medida con el sistema de clasificación LOCS III.

- El tamaño muestral no es suficientemente grande para poder extrapolar los resultados a la población. Sería necesario ampliar el número de pacientes analizados en futuros estudios para confirmar los datos obtenidos en nuestra muestra.
- El análisis de otros factores que pudieran interferir en la homeostasis telomérica, como pueden ser la metilación y la desacetilación de las histonas o la influencia que procesan las shelterinas en el complejo telomerasa-elongación ADN telomérico, tendría un especial interés con vistas a afianzar los resultados de nuestro trabajo.

#### **4. PERSPECTIVAS DE FUTURO**

La presencia de catarata en pacientes de edad temprana para su desarrollo podría suponer un marcador de envejecimiento prematuro en estos sujetos. Por lo tanto, la determinación de la presencia de cataratas en este tipo de pacientes debería ir acompañado del estudio de otras enfermedades asociadas a la edad, con el objetivo de establecer un diagnóstico y tratamiento precoz de las mismas, y conseguir aminorar los posibles efectos nocivos para el paciente



# CONCLUSIONES

---



De acuerdo con los objetivos planteados en este Trabajo de Tesis Doctoral y como consecuencia de los resultados obtenidos y su discusión, hemos llegado a las siguientes conclusiones:

**Primera:** Existe un mayor acortamiento telomérico en los leucocitos de sangre periférica de pacientes con cataratas respecto a los que no presentan cataratas, independientemente de la edad, lo que sugiere que el desarrollo de esta patología se asocia a un envejecimiento celular en sangre periférica.

**Segunda:** Los pacientes menores de 55 años con cataratas presentan una longitud telomérica significativamente inferior a la de personas con cataratas mayores de 60 años, por lo que, de confirmarse estos resultados en otras series, el estudio del tamaño de los telómeros en sangre periférica podría emplearse como un indicador de predicción de desarrollo precoz de opacidad del cristalino.

**Tercera:** En nuestra serie de pacientes no se observa una asociación significativa entre los factores de riesgo estudiados y la longitud de los telómeros, excepto en el caso del consumo de tabaco, donde aparece un mayor acortamiento telomérico en los casos/controles mayores de 60 años fumadores, lo que confirma resultados preliminares de otros grupos.

**Cuarta:** Nuestro trabajo no muestra una asociación significativa entre la presencia de cataratas en los pacientes menores de 55 años y las variantes alélicas estudiadas en los genes TERT y TERC, a pesar de que dichas variantes modifican la expresión de estos genes. Deben de existir otras variantes génicas en estos o en otros genes reguladores del tamaño de los telómeros, no incluidas en nuestro estudio, que implique el acortamiento telomérico observado.



## BIBLIOGRAFÍA

---



1. Honrubia FM. Oftalmología General. 1ª Edición. Zaragoza: E pharmacia Ophthalmology ; 2002.
2. Tripathi RC, Tripathi BJ. Lens morphology, aging, and cataract.J Gerontol. 1983; 38: 258-270.
3. Persaud T, Moore K. Embriología Clínica. 6ª edición. México: Mc-Graw Hill Internacional; 1999.
4. Langman S. Embriología Médica con Orientación Clínica .10ª Edición. Montana: Panamericana; 2010.
5. Lorente y Mendicute. Cirugía del Cristalino, Ponencia Oficial de la Sociedad Española de Oftalmología.1ª edición. Sevilla: Sociedad Española de Oftalmología; 2008.
6. Kuszak JR, Zoltoski RK, Tiedemann CE. Development of lens sutures.Int J Dev Biol. 2004; 48: 889-902.
7. Glasser A, Campbell MA. Biometric, optical and physical changes in the isolated human crystalline lens with age in relation to presbyopia.Vision Res. 1999; 39: 1991-2015.
8. Parmigiani C, McAvoy J. Localisation of laminin and fibronectin during rat lens morphogenesis. Differentiation. 1984; 28: 53-61.
9. Parmigiani CM, McAvoy JW.A morphometric analysis of the development of the rat lens capsule. Curr Eye Res. 1989; 8: 1271-1277.
10. Harding CV, Reddan JR, Unakar NJ, Bagchi M. The control of cell division in the ocular lens.Int Rev Cytol. 1997; 131: 215-300.
11. Garland DL, Duglas-Tabor Y,Jimenez-Asensio J, Datiles MB, Magno B. The nucleus of the human lens: demonstration of a highly characteristic protein pattern by two dimensional electrophoresis and introduction of a new method of lens dissection. Exp Eye Res. 1996; 62: 285-291.

- 12.** Kuszak JR, Ennesser CA, Umlas J, Macsai-Kaplan MS, Weinstein RS. The ultrastructure of fiber cells in primate lenses: a model for studying membrane senescence. *J Ultrastruct Mol Struct Res.* 1988; 100: 60-74.
- 13.** Walsh KT, Fielding J, Long MB. Effect of light-collection geometry on reconstruction errors in Abel inversions. *Opt Lett.* 2000; 25: 457-459.
- 14.** Bettelheim FA, Chylack LT Jr. Light scattering of whole excised human cataractous lenses. Relationships between different light scattering parameters. *Exp Eye Res.* 1985; 41: 19-30.
- 15.** Slingsby C, Driessen HP, Mahadevan D, Bax B, Blundell TL. Evolutionary and functional relationships between the basic and acidic beta-crystallins. *Exp Eye Res.* 1988; 46: 375-403.
- 16.** Carter JM, Hutcheson AM, Quinlan RA. In vitro studies on the assembly properties of the lens proteins CP49, CP115: coassembly with alpha-crystallin but not with vimentin. *Exp Eye Res.* 1995; 60: 181-192.
- 17.** Grujters WT, Kistler J, Bullivant S, Goodenough DA. Immunolocalization of MP70 in lens fiber 16-17-nm intercellular junctions. *J Cell Biol.* 1987; 104: 565-572.
- 18.** Spector A, Wang GM, Wang RR, Li WC, Kleiman NJ. A brief photochemically induced oxidative insult causes irreversible lens damage and cataract. II. Mechanism of action. *Exp Eye Res.* 1995; 60: 483-493.
- 19.** Cvekl A, Piatigorsky J. Lens development and crystallin gene expression: many roles for Pax-6. *Bioessays.* 1996; 18: 621-630.
- 20.** Brian G, Taylor H. Cataract blindness challenges for the 21st century. *Bull World Health Organ.* 2001; 79: 249-256.
- 21.** Sturmer J. Cataracts - trend and new developments. *Ther Umsch.* 2009; 66: 167-171.



- 22.** Datiles MB III, Magno BV, Freidlin V. Study of nuclear cataract progression using the National Eye Institute Scheimpflug system. *Br J Ophthalmol.* 1995; 79: 527-534.
- 23.** Fonseca A, Abelairas J, Rodríguez JM, Carpio R, Gabarrón MA, Peralta J, Sánchez E, Pérez A. Capítulo 5: Cataratas infantiles. En: Fonseca A, Abelairas J, Rodríguez JM, Peralta J editores. *Actualización en cirugía oftalmológica pediátrica.* Barcelona: Tecnimedia editorial. LXXVI Ponencia Oficial de la SEO 2000.
- 24.** Alemañy J, Villar R. Capítulo 13: Catarata En: Alemañy J, Villar R. *Oftalmología.* La Habana: Ciencia Médica; 2003.
- 25.** Morales M. Protocolo de manejo de las cataratas en la edad pediátrica. *Annals d'Oftalmologia.* 2007; 15: 206-211.
- 26.** Teszas A, Pfund Z, Morava E, Kosztolanyi G, Sistermans E, Wevers RA, Kellermayer R. Presenile cataract: consider cholestanol. *Arch Ophthalmol.* 2006; 124: 1490-1492.
- 27.** Lesiewska H, Malukiewicz G. Senile and presenile cataract: comparison of patients operated in the year 1990-2000. *Klin Oczna.* 2002; 104: 347-349.
- 28.** Truscott RJW. Human cataract: the mechanisms responsible; light and butterfly eyes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2003; 35: 1500-1504.
- 29.** Truscott RJW. Age-related nuclear cataract- Oxidation is the key. *Experimental Eye Research.* 2005; 80: 709-725.
- 30.** Harding JJ. Physiology, biochemistry, pathogenesis and epidemiology of cataract. *Current Opinion in Ophthalmology.* 1991; 2: 3-15.
- 31.** Chylack LT, Wolfe JK, Singer DM, Leske C, Bullimore MA, Bailey IL, Friend J, McCarthy D, Shu-Yuh W. The Lens Opacities Classification System III. *Arch Ophthalmol.* 1993; 111: 831-836.

- 32.** Chylack LT, Leske MC, McCarthy D, Khu PM, Kashiwagi T, Sperduto R. Lens Opacities Classification System II (LOCS II). Arch Ophthalmol . 1989; 107: 991-997.
- 33.** Gieser SC, Schein OD. Cataract epidemiology and world blindness.Current Opinion in Ophthalmology. 1994; 5: 5-8.
- 34.** Sparrow JM, Bron AJ, Brown NA, Ayliffe W, Hill AR, Spector A. Oxidative stress-induced cataract: mechanism of action. FASEB J. 1995; 9: 1173-1182.
- 35.** Klein BE, Klein R, Linton KL, Magli YL, Neider MW. Assessment of cataracts from photographs in the Beaver Dam Eye Study.Ophthalmology. 1990; 97: 1428-1433.
- 36.** Kupfer C. The conquest of cataract: a global challenge. Trans Ophthal Soc UK. 1984; 104: 1.
- 37.** Organization WH. Use of intraocular lenses in cataract surgery in developing countries. Bull World Health Org. 1991; 69: 657.
- 38.** Schwab L. Cataract blindness in developing nations. Int Ophthalmol Clin. 1990; 30:16.
- 39.** Chew M, Pei-Chia Chiang P, Zheng Y, Lavanya R, Wu R, Saw SM, Wong TY, Lamoureux EL. The Impact of Cataract, Cataract Types, and Cataract Grades on Vision-Specific Functioning Using Rasch Analysis.American Journal of Ophthalmology. 2012; 154: 29-38.
- 40.** Pongo Águila L, Carrión R, Luna W, Silva JC, Limburg H. Ceguera por catarata en personas mayores de 50 años en una zona semirrural del norte del Perú. Rev Panam Salud Pública. 2005; 17: 387–393.
- 41.** Thylefors B. The WHO Programme for the Prevention of Blindness and Cataract in Developing Countries.Doc Ophthalmol. 1992; 81: 339-344.

- 42.** Foster A, Johnson G. Blindness in the Developing World. *Br J Ophthalmol*. 1993; 77: 398-399.
- 43.** Yawson AE, Ackuaku-Dogbe EM, Seneadza NA, Mensah G, Minicuci N, Naidoo N, Chatterji S, Kowal P, Biritwum RB. Self-reported cataracts in older adults in Ghana: sociodemographic and health related factors. *BMC Public Health*. 2014; 14: 949.
- 44.** Bochow TW, West SK, Azar A, Muñoz B, Sommer A, Taylor HR. Ultraviolet Light Exposure and Risks of Posterior Subcapsular Cataracts. *Arch Ophthalmol*. 1989; 107: 369-372.
- 45.** Cruickshanks KJ, Klein BE, Klein R. Ultraviolet Light Exposure and Lens Opacities: The Beaver Dam Eye Study. *Am J Public Health*. 1992; 82: 1658-1662.
- 46.** Keith R, Solomon KR. Effects of ozone depletion and UV-B radiation on humans and the environment. *Atmosphere- Ocean*. 2008; 46: 185-202.
- 47.** Taylor HR, West SK, Rosenthal FS, Muñoz B, Newland HS, Abbey H, Emmet EA. Effect of Ultraviolet Radiation on Cataract Formation. *N Engl J Med*. 1988; 319: 1429-1433.
- 48.** Acosta R, Hoffmeister L, Román R, Comas M, Castilla M, Castells X. Revisión Sistemática De Estudios Poblacionales De Prevalencia De Catarata. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2006; 81: 509-516.
- 49.** Reidy A, Minassian DC, Desai P, Vafidis G, Joseph J, Farrow S, Connolly A. Increased mortality in women with cataract: a population based follow up of the North London Eye Study. *Br J Ophthalmol*. 2002; 86: 424-428.
- 50.** Desai N, Copeland RA. Socioeconomic disparities in cataract surgery. *Curr Opin Ophthalmol*. 2013; 24: 74-78.

- 51.** Giuffre G, Giammanco R, Di Pace F, Ponte F. Casteldaccia eye study: prevalence of cataract in the adult and elderly population of a Mediterranean town. *Int Ophthalmol*. 1995; 18: 363–371.
- 52.** Klein BEK, Klein R, Linton KLP. Prevalence of age-related lens opacities in a population: the Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology*. 1992; 99: 546 –552.
- 53.** Maraini G, Pasquini P, Sperduto RD, Rosimi F, Bonacini M, Tomba MC, Corona R. Distribution of lens opacities in the Italian-American case-control study of age-related cataract. *Ophthalmology*. 1990; 97: 752–756.
- 54.** Mitchell P, Cumming RG, Attebo K, Panchapakesan J. Prevalence of cataract in Australia: the Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology*. 1997; 104: 581–588.
- 55.** Sperduto RD, Hiller R. The prevalence of nuclear, cortical, and posterior subcapsular lens opacities in a general population sample. *Ophthalmology*. 1984; 91: 815–818.
- 56.** Michael R, Bron AJ. The ageing lens and cataract: a model of normal and pathological ageing. *Phil Trans R Soc B*. 2011; 366: 1278–1292.
- 57.** Reddy MA, Francis PJ, Berry V, Bhattacharya SS, Moore AT. Molecular genetic basis of inherited cataract and associated phenotypes. *Surv Ophthalmol*. 2004; 49: 300–315.
- 58.** Bassnett S. Lens organelle degradation. *Exp Eye Res*. 2002; 74: 1-6.
- 59.** Bassnett S. Fiber cell denucleation in the primate lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997; 38: 1678-1687.
- 60.** Bassnett S, Shi Y, Vrensen GF. Biological glass: structural determinants of eye lens transparency. *Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2011; 366: 1250-1264.

- 61.** Thorne JE, Daniel E, Jabs DA, Kedhar SR, Peters GB, Dunn JP. Smoking as a risk factor for cystoids macular edema complicating intermediate uveitis. *Am J Ophthalmol*. 2008; 145:841–846.
- 62.** Lin P, Loh AR, Margolis TP, Acharya NR. Cigarette smoking as a risk factor for uveitis. *Ophthalmology*. 2010; 117: 585–590.
- 63.** Philips CI, Clayton RM, Cuthbert J, Qian W, Donnelly CA, Prescott RJ. Human cataract risk factors: significance of abstention from, and high consumption of ethanol (U-curve) and non-significance of smoking. *Ophthalmic Res*. 1996; 28: 237-247.
- 64.** West SK, Muñoz B, Schein OD, Vitale S, Maguire M, Taylor HR, Bressler NM. Cigarette smoking and risk for progression of nuclear opacities. *Arch Ophthalmol*. 1995; 113: 1377-1380.
- 65.** Klein BE, Klein R, Linton KL, Franke T. Cigarette smoking and lens opacities: the Beaver Dam Eye Study. *Am J Prev Med* . 1993; 9: 27–30.
- 66.** Krishnaiah S, Vilas K, Shamanna BR, Rao GN, Thomas R, Balasubramanian D. Smoking and its association with cataract: results of the Andhra Pradesh eye disease study from India. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005; 46: 58–65.
- 67.** Lu ZQ, Sun WH, Yan J, Jiang TX, Zhai SN, Li Y. Cigarette smoking, body mass index associated with the risks of age-related cataract in male patients in northeast China. *Int J Ophthalmol*. 2012; 5: 317-322.
- 68.** Solberg Y, Rosner M, Belkin M. The association between cigarette smoking and ocular diseases. *Surv Ophthalmol*. 1998; 42: 535–547.
- 69.** Tarwadi KV, Agte VV. Interrelationships between nutritional status, socioeconomic factors, and lifestyle in Indian cataract patients. *Nutrition*. 2011; 27: 40-45.
- 70.** Ritter LL, Klein BEK, Klein R, Mares-Periman JA. Alcohol use and lens opacities in The Beaver Dam Study. *Arch Ophthalmol*. 1993; 111: 113-117.

- 71.** Muñoz B, Tajchman U, Bochow T, West S. Alcohol use and risk of posterior subcapsular opacities. *Arch Ophthalmol*.1993; 111: 110-112.
- 72.** Harding JJ, Egerton M, van Heyningen R, Harding RS. Diabetes, glaucoma, sex, and cataract: analysis of combined data from two case control studies. *British Journal of Ophthalmology*. 1993; 77: 2-6.
- 73.** Kahn HA, Leibowitz M, Ganley JP, Kini MM, Colton T, Nickerson RS , Dawber TR. The Framingham eye study. II. Association of ophthalmic pathology with single variables previously measured in the Framingham heart study. *American Journal of Epidemiology*. 1977; 106: 33-41.
- 74.** Li L, Wan XH, Zhao GH. Meta-analysis of the risk of cataract in type 2 diabetes. *BMC Ophthalmol*. 2014; 14: 94.
- 75.** Stanga PE, Boyd SR, Hamilton AMP. Ocular manifestations of diabetes mellitus.*Current Opinion in Ophthalmology*.1999; 10: 483-489.
- 76.** Tabin G, Chen M, Espandar L. Cataract surgery for the developing world. *Current Opinion in Ophthalmology*. 2008; 19: 55-59.
- 77.** Misra SL, Goh YW, Patel DV, Riley AF, McGhee CN. Corneal microstructural changes in nerve fiber, endothelial and epithelial density after cataract surgery in patients with diabetes mellitus. *Cornea*. 2015; 34: 177-181.
- 78.** Kirboga K, Ozec AV, Kosker M, Dursun A, Toker MI, Aydin H, Erdogan H, Topalkara A, Arici MK. The Association between Diabetic Retinopathy and Levels of Ischemia-Modified Albumin, Total Thiol, Total Antioxidant Capacity, and Total Oxidative Stress in Serum and Aqueous Humor.*J Ophthalmol*. 2014; 2014: 820-853.
- 79.** Kinoshita JH. Mechanisms initiating cataract formation. Proctor lecture. *Investigative Ophthalmology* . 1974; 13: 713-724.

- 80.** Kinoshita JH, Fukushi S, Kador P, Merola LO. Aldose reductase in diabetic complications of the eye. *Metabolism*. 1979; 28: 462-469.
- 81.** Snow A, Shieh B, Chang KC, Pal A, Lenhart P, Ammar D, Ruzycki P, Palla S, Reddy GB, Petrash JM. Aldose reductase expression as a risk factor for cataract. *Chem Biol Interact*. 2014; 22.
- 82.** Srivastava SK, Ramana KV, Bhatnagar A. Role of aldose reductase and oxidative damage in diabetes and the consequent potential for therapeutic options. *Endocrine Reviews*. 2005; 26: 380-392.
- 83.** Takamura Y, Sugimoto Y, Kubo E, Takahashi Y, Akagi Y. Immunohistochemical study of apoptosis of lens epithelial cells in human and diabetic rat cataracts. *Japanese Journal of Ophthalmology*. 2001; 45: 559-563.
- 84.** Li WC, Kuszak JR, Dunn K, Wang RR, Ma W, Wang GM, Spector A et al. Lens epithelial cell apoptosis appears to be a common cellular basis for non congenital cataract development in humans and animals. *Journal of Cell Biology*. 1995; 130: 169-181.
- 85.** Wilson ME Jr, Levin AV, Trivedi RH, Kruger SJ, Elliott LA, Ainsworth JR, Awner S, Cruz OA, Kivlin J, Vroman DT, Young WO. Cataract associated with type-1 diabetes mellitus in the pediatric population. *Journal of AAPOS*. 2007; 11: 162-165.
- 86.** Datiles MB III, Kador PF. Type I diabetic cataract. *Archives of Ophthalmology*. 1999; 117: 284-285.
- 87.** Clayton RM, Cuthbert J, Phillips CI, Bartholomew RS, Stokoe NL, Ffytche T, McK. Reid J, Duffy J, Seth J, Alexander M. Analysis of individual cataract patients and their lenses: a progress report. *Exp Eye Res*. 1980; 31: 553-566.
- 88.** Yu X, Lyu D, Dong X, He J, Yao K. Hypertension and risk of cataract: a meta-analysis. *PLoS One*. 2014; 9: 1-27.

- 89.** Nemet AY, Vinker S, Levartovsky S, Kaiserman I. Is cataract associated with cardiovascular morbidity? *Eye*. 2010; 24: 1352-1358.
- 90.** Cumming RG, Mitchell P. Medications and cataracts. The Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology*. 1998; 105: 1751-1758.
- 91.** Leske MC, Wu SY, Hennis A, Connell AMS, Hyman L, Schachat A and The Barbados Eye Study Group 124. Diabetes, hypertension, and central obesity as cataract risk factors in a black population. The Barbados Eye Study. *Ophthalmology*. 1999; 106: 35-41.
- 92.** Klein R, Klein BE, Moss SE, Wong TY, Hubbard L, Cruickshanks KJ, Palla M. The relation of retinal vessel caliber to the incidence and progression of diabetic retinopathy: XIX: the Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. *Arch Ophthalmol*. 2004; 122: 76-83.
- 93.** Burgess CA, Sowers M. Systemic hypertension and senile cataracts: an epidemiologic study. *Optom Vis Sci*. 1992; 69: 320-324.
- 94.** Tan AG, Mitchell P, Burlutsky G, Rochtchina E, Kanthan G, Islam FMA, Wang JJ. Retinal vessel caliber and the long-term incidence of age-related cataract: the Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology*. 2008; 115: 1693-1698.
- 95.** Galichanin K, Löfgren S, Söderberg P. Cataract after repeated daily in vivo exposure to ultraviolet radiation. *Health Phys*. 2014; 107: 523-529.
- 96.** De Gruijl FR, Longstreth J, Norval M, Cullen AP, Slaper H, Kripke ML, Takizawa Y, Van Der Leun JC. Health Effects From Stratospheric Ozone Depletion And Interactions With Climate Change. *Photochem Photobiol Sci*. 2003; 2: 16-28.
- 97.** Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem*. 2015; 30: 11-26.



- 98.** Kwok L S, Daszynski DC, Kuznetsov VA, Pham T, Ho A, Coroneo MT. Peripheral Light Focusing As A Potential Mechanism For Phakic Dysphotopsia And Lens Phototoxicity. *Ophthalmic Physiol Optics*. 2004; 24: 119-129.
- 99.** Kin ST, Koh JW. Mechanisms of Apoptosis on Human Lens Epithelium after Ultraviolet Light Exposure. *Korean J Ophthalmol*. 2011; 25: 196-201.
- 100.** Parisi AV, Downs N. Cloud cover and horizontal plane eye damaging Solar UV Exposures. *Int J Biometeorol*. 2004; 49: 130-136.
- 101.** Parisi AV, Downs N. Variation of the Enhanced Biologically Damaging Solar UV due to Clouds. *Photochem Photobiol*. 2004; 3: 643-647.
- 102.** Klein BEK, Lee KE, Danforth LG, Schaich TM, Cruickshanks KJ, Klein R. Selected Sun-Sensitizing Medications and Incident Cataract. *Arch Ophthalmol*. 2010; 128: 959-963.
- 103.** Chaluppecky H. Centralblatt für praktische Augenheilkunde. En: Hirschberg J. Ueber die Wirkung der Röntgenstrahlen. Germany: Veit & Comp.; 1897. p. 386-401.
- 104.** Vano E, Kleiman NJ, Duran A, Rehani MM, Echeverri D, Cabrera M. Radiation cataract risk in interventional cardiology personnel. *Radiat Res*. 2010; 174: 490-495.
- 105.** Chodick G, Bekiroglu N, Hauptmann M, Alexander BH, Freedman DM, Doody MM, Cheung LC, Simon SL, Weinstock RM, Bouville A, Sigurdson AJ. Risk of cataract after exposure to low doses of ionizing radiation: a 20-year prospective cohort study among US radiologic technologists. *Am J Epidemiol*. 2008; 168: 620-631.
- 106.** Wilde G, Sjöstrand J. A clinical study of radiation cataract formation in adult lifefollowing g irradiation of the lens in early childhood. *Br J Ophthalmol*. 1997; 81: 261-266.
- 107.** Luntz MH. Clinical types of cataract. In: Duane's Ophthalmology on CD ROM. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1996. Vol 1, Chap. 73.

- 108.** Sánchez Rico CR, Fernández Aparicio AJ, Pérez Moreno A, Rodríguez Sánchez FA, Estéban Ortega M. Cataratas cortisónicas en portadores de lentes de contacto. *Rev Esp de Contactología*. 1996; 6: 111-114.
- 109.** Jones WL. Traumatic injury to the lens. *Optom Clin*. 1991; 1: 125-142.
- 110.** Yasukawa T, Kita M, Honda Y. Traumatic cataract with a ruptured posterior capsule from a non-penetrating ocular injury. *J Cataract Refract Surg*. 1998; 24: 868-869.
- 111.** Fagerholm PP. The response of the lens to trauma. *Trans Ophthalmol Soc U K*. 1982; 10: 369-374.
- 112.** Canavan YM, Archer DB. Anterior segment consequences of blunt ocular injury. *Br J Ophthalmol*. 1982; 66: 549-555.
- 113.** Feldman F, Heathcote JG. Persistence of intralenticular squamous epithelium after trauma. *Can J Ophthalmol*. 1992; 27: 32-33.
- 114.** Drincic R, Smiljanic N, Vukosavljevic M, Durovic B, Tanjga S. Analysis of treatment of perforating ocular injuries during warfare in Bosnia-Herzegovina. *Vojnosanit Pregl*. 1994; 51: 381-383.
- 115.** Hu T, Zhang F, Wang W. Surgical treatment of traumatic cataract. *Chung Hua Yen Ko Tsa Chih*. 1995; 31: 13-15.
- 116.** Shah M, Shah S, Upadhyay P, Agrawal R. Controversies in traumatic cataract classification and management: a review. *Can J Ophthalmol*. 2013; 48: 251-258.
- 117.** Haugen OH, Hovding G, Riise R. Ocular changes in Down syndrome. *Tidsskr Nor Laegeforen*. 2004; 124: 186-188.
- 118.** Evans DGR. Neurofibromatosis type 2 (NF2): A clinical and molecular review. *Orphanet J Rare Dis*. 2009; 4: 16.

- 119.** Chopra R, Chander A, Jacob JJ. Ocular associations of metabolic syndrome. *Indian J Endocrinol Metab.* 2012; 16: 6-11.
- 120.** Truscott RJ. Presbyopia. Emerging from a blur towards an understanding of the molecular basis for this most common eye condition. *Exp Eye Res.* 2009; 88: 241-247.
- 121.** Weeber H A, Eckert G, Pechhold W, Van der Heijde RG. Stiffness gradient in the crystalline lens. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2007; 245: 1357-1366.
- 122.** Glasser A. Restoration of accommodation. *Curr Opin Ophthalmol.* 2006; 17: 12-18.
- 123.** Sharma KK, Santhoshkumar P. Lens aging: effects of crystallins. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1790: 1095-1108.
- 124.** Santhoshkumar P, Udupa P, Murugesan R, Sharma KK. Significance of interactions of low molecular weight crystallin fragments in lens aging and cataract formation. *J Biol Chem.* 2008; 283: 8477-8485.
- 125.** Shang F, Taylor A. Function of the ubiquitin proteolytic pathway in the eye. *Exp Eye Res.* 2004; 78: 1-14.
- 126.** Babizhayev MA. New concept in nutrition for the maintenance of the aging eye redox regulation and therapeutic treatment of cataract disease; synergism of natural antioxidant imidazole-containing amino acid-based compounds, chaperone, and glutathione boosting agents: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in human. *American Journal of Therapeutics.* 2010; 17: 373-389.
- 127.** Harding JJ. Free and protein bound glutathione in normal and cataractous human lenses. *Biochem J.* 1970; 117: 957-960.
- 128.** Sanderson J, Marcantonio J M, Duncan G. A human lens model of cortical cataract: Ca<sup>2+</sup>-induced protein loss, vimentin cleavage and opacification. *Invest Ophthalmol. Vis Sci.* 2000; 41: 2255-2261.

- 129.** Strachan T, Read AP. Human Molecular Genetics. Oxford: BIOS scientific Publishers; 1996.
- 130.** Castro E. Estudio de polimorfismos de genes reparadores de ADN en cáncer de mama. [Tesis doctoral] Salamanca: Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Salamanca; 2010.
- 131.** Johnson AB, Barton MC. Hypoxia-induced and stress-specific changes in chromatin structure and function. *Mutat Res.* 2007; 618: 149-162.
- 132.** Sasaki H, Lin LR, Yokoyama T, Sevilla MD, Reddy VN, Giblin FJ. TEMPOL protects against lens ADN strand breaks and cataract in the X-rayed rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998; 39: 544-52.
- 133.** Pendergrass W, Penn P, Possin D, Wolf N. Accumulation of ADN, nuclear and mitochondrial debris, and ROS at sites of age-related cortical cataract in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005; 46: 4661-4670.
- 134.** Wood RD, Mitchell M, Sgouros J, Lindahl T. Human ADN repair genes. *Science.* 2001; 291: 1284-1289.
- 135.** De Boer J, Hoeijmakers JHJ. Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis.* 2000; 21: 453-460.
- 136.** Bridge G, Rashid S, Martin SA. ADN mismatch repair and oxidative ADN damage: implications for cancer biology and treatment. *Cancers (Basel).* 2014; 6: 1597-1604.
- 137.** Truong LN, Li Y, Sun E, Ang K, Hwang PY, Wu X. Homologous recombination is a primary pathway to repair ADN double-strand breaks generated during ADN rereplication. *J Biol Chem.* 2014; 289: 28910-28923.
- 138.** Friedberg E. How Nucleotide excision repair protects against Cancer. *Nature review Cancer.* 2001; 1: 22-23.

- 139.** Shen JC, Fox EJ, Ahn EH, Loeb LA. A rapid assay for measuring nucleotide excision repair by oligonucleotide retrieval. *Sci Rep.* 2014; 4: 4894.
- 140.** Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature.* 2001; 411: 366-374.
- 141.** Ladiges W, Wiley J, MacAuley A. Polymorphisms in the ADN repair gene XRCC1 and age-related disease. *Mech Ageing Dev.* 2003; 124:27-32.
- 142.** Stern MC, Siegmund KD, Conti DV, Corral R, Haile RW. XRCC1, XRCC3, and XPD polymorphisms as modifiers of the effect of smoking and alcohol on colorectal adenoma risk. *Cancer Biomarkers Prev.* 2006; 15: 2384-2390.
- 143.** Liu G, Zhou W, Yeap BY, Su L, Wain JC, Ponderos JM, Nishioka NS, Lynch TJ, Christiani DC. XRCC1 and XPD polymorphisms and esophageal adenocarcinoma risk. *Carcinogenesis.* 2007; 28: 1254-1258.
- 144.** Povey JE, Darakhshan F, Robertson K, Bisset Y, Mekky M, Rees J, Doherty V, Kavanagh G, Anderson N, Campbell H, Mackie RM, Melton DW. ADN repair gene polymorphisms and genetic predisposition to cutaneous melanoma. *Carcinogenesis.* 2007; 28: 1087-1093.
- 145.** Steck SE, Butler LM, Keku T, Antwi S, Galanko J, Sandler RS, Hu JJ. Nucleotide excision repair gene polymorphisms, meat intake and colon cancer risk. *Mutat Res Fundam Mol Mech Mutagen.* 2014; 762: 24-31.
- 146.** Jones S, Wang TL, Shih IeM, Mao TL, Nakayama K, Roden R, Glas R, Slamon D, Diaz LA Jr, Vogelstein B, Kinzler KW, Velculescu VE, Papadopoulos N. Frequent mutations of chromatin remodeling gene ARID1A in ovarian clear cell carcinoma. *Science.* 2010; 330: 228-231.
- 147.** Wiegand KC, Shah SP, Al-Agha OM, Zhao Y, Tse K, Zeng T, Senz J, McConechy MK, Anglesio MS, Kalloger SE, Yang W, Heravi-Moussavi A, Giuliany R, Chow C, Fee J, Zayed

A, Prentice L, Melnyk N, Turashvili G, Delaney AD, Madore J, Yip S, McPherson AW, Ha G, Bell L, Fereday S, Tam A, Galletta L, Tonin PN, Provencher D, Miller D, Jones SJ, Moore RA, Morin GB, Oloumi A, Boyd N, Aparicio SA, Shih leM, Mes-Masson AM, Bowtell DD, Hirst M, Gilks B, Marra MA, Huntsman DG. ARID1A mutations in endometriosis-associated ovarian carcinomas. *The New England Journal of Medicine*. 2010; 363: 1532-1543.

**148.** Chiu CP, Harley CB. Replicative senescence and cell immortality: the role of telomeres and telomerases. *Exp Biol Med*. 1997; 214: 99.

**149.** Berg JM, Stryer L, Tymoczko JL. *Biochemistry*. 6<sup>ª</sup> edición. New York: WH Freeman; 2007.

**150.** Baumann P, Cech TR. Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans. *Science*. 2001; 292: 1171-1175.

**151.** Gasser SM. A sense of the end. *Science*. 2000; 288: 1377-1379.

**152.** Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, de Lange T. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*. 1999; 97: 503-514.

**153.** O'Sullivan RJ, Karlseder J. Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2010; 11: 171-181.

**154.** Martin GM, Sprague CA, Epstein CJ. Replicative life-span of cultivated human cells. Effects of donor's age, tissue, and genotype. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1970; 23: 86-92.

**155.** Hayflick, L. Human cells and aging. *Scientific American*. 1968; 218: 32-37.

**156.** Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*. 1994; 266: 2011-2015.

- 157.** Ulaner GA, Hu JF, Vu TH, Giudice LC, Hoffman AR. Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternate splicing of hTERT transcripts. *Cancer Research*. 1998; 58: 4168-4172.
- 158.** Kyo S, Kanaya T, Takakura M, Tanaka M, Inoue M. Human telomerase reverse transcriptase as a critical determinant of telomerase activity in normal and malignant endometrial tissues. *International Journal of Cancer*. 1999; 80: 60-63.
- 159.** Ueda M, Ouhtit A, Bito T, Nakazawa K, Lübke J, Ichihashi M, Yamasaki H, Nakazawa H. Evidence for UV-associated activation of telomerase in human skin. *Cancer Research*. 1997; 57: 370-374.
- 160.** Norrback KF, Roos G. Telomeres and telomerase in normal and malignant haematopoietic cells. *Eur J Cancer*. 1997; 33: 774-780.
- 161.** Weng N, Levine BL, June CH, Hodes RJ. Regulation of telomerase RNA template expression in human T lymphocyte development and activation. *J Immunol*. 1997; 158: 3215-3220.
- 162.** Igarashi H, Sakaguchi N. Telomerase activity is induced in human peripheral B lymphocytes by the stimulation to antigen receptor. *Blood*. 1997; 89: 1299-1307.
- 163.** Blackburn EH. Telomere states and cell fates. *Nature*. 2000; 408: 53-56.
- 164.** Shampay J, Blackburn EH. Generation of telomere-length heterogeneity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988; 85: 534-538 .
- 165.** Blackburn EH. The end of the (ADN) line. *Nature structural biology*. 2000; 7: 847-850.

- 166.** Cohen SB, Graham ME, Lovrecz GO, Bache N, Robinson PJ, Reddel RR. Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells. *Science*. 2007; 315, 1850-1853.
- 167.** Babizhayev MA, Vishnyakova KS, Yegorov YE. Telomere-dependent senescent phenotype of lens epithelial cells as a biological marker of aging and cataractogenesis: the role of oxidative stress intensity and specific mechanism of phospholipid hydroperoxide toxicity in lens and aqueous. *Fundam Clin Pharmacol*. 2011; 25: 139-162.
- 168.** Babizhayev MA, Yegorov YE. Telomere attrition in lens epithelial cells - a target for N-acetylcarnosine therapy. *Front Biosci*. 2010; 15: 934-956.
- 169.** Babizhayev MA, Yegorov YE. Biomarkers of oxidative stress and cataract. Novel drug delivery therapeutic strategies targeting telomere reduction and the expression of telomerase activity in the lens epithelial cells with N-acetylcarnosine lubricant eye drops: anti-cataract which helps to prevent and treat cataracts in the eyes of dogs and other animals. *Curr Drug Deliv*. 2014; 11: 24-61.
- 170.** Matsubara Y, Murata M, Yoshida T, Watanabe K, Saito I, Miyaki K, Omae K, Ikeda Y. Telomere length of normal leukocytes is affected by a functional polymorphism of hTERT. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006; 341:128-131.
- 171.** Pendergrass WR, Penn PE, Li J, Wolf NS. Age-related telomere shortening occurs in lens epithelium from old rats and is slowed by caloric restriction. *Exp Eye Res*. 2001; 73: 221-228.
- 172.** Von Zglinicki T. Will your telomeres tell your future? *BMJ*. 2012; 344: 1727.
- 173.** Sanders JL, Iannaccone A, Boudreau RM, Conley YP, Opresko PL, Hsueh WC, Cummings SR, Cawthon RM, Harris TB, Nalls MA, Kritchevsky SB, Newman AB; Health



ABC Study. The association of cataract with leukocyte telomere length in older adults: defining a new marker of aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2011; 66: 639-645.

**174.** Von Zglinicki T, Martin-Ruiz CM. Telomeres as biomarkers for ageing and age-related diseases. *Curr Mol Med*. 2005; 5: 197-203.

**175.** Aviv A, Valdes AM, Spector TD. Human telomere biology: pitfalls of moving from the laboratory to epidemiology. *Int J Epidemiol*. 2006; 35: 1424-1429.

**176.** Perez-Rivera JA, Pabon-Osuna P, Cieza-Borrella C, Martin-Herrero F, Gonzalez-Porras JR, Gonzalez-Sarmiento R. Prognostic value of telomere length in acute coronary syndrome. *Mech Ageing Dev*. 2012; 133: 695-697.

**177.** Perez-Rivera JA, Pabon-Osuna P, Cieza-Borrella C, Duran-Bobin O, Martin-Herrero F, Gonzalez-Porras JR, Gonzalez-Sarmiento R. Effect of telomere length on prognosis in men with acute coronary syndrome. *Am J Cardiol*. 2014; 113: 418-421.

**178.** de Rooij SR, Roseboom TJ. The developmental origins of ageing: study protocol for the Dutch famine birth cohort study on ageing. *BMJ Open*. 2013; 3.

**179.** Weischer M, Bojesen SE, Nordestgaard BG. Telomere shortening unrelated to smoking, body weight, physical activity, and alcohol intake: 4,576 general population individuals with repeat measurements 10 years apart. *PLoS Genet*. 2014; 10: 1-30.

**180.** Mirabello L, Huang WY, Wong JY, Chatterjee N, Reding D, Crawford ED, De Vivo I, Hayes RB, Savage SA. The association between leukocyte telomere length and cigarette smoking, dietary and physical variables, and risk of prostate cancer. *Aging Cell*. 2009; 8: 405-413.

**181.** Njajou OT, Blackburn EH, Pawlikowska L, Mangino M, Damcott CM, Kwok PY, Spector TD, Newman AB, Harris TB, Cummings SR, Cawthon RM, Shuldiner AR, Valdes AM, Hsueh WC. A common variant in the telomerase RNA component is associated with short telomere length. *PLoS One*. 2010; 5: 130-148.

- 182.** Allen D. Cataract. *BMJ Clin Evid.* 2011; 15: 1-24.
- 183.** Fyhrquist F, Saijonmaa O, Strandberg T. The role of senescence and telomere shortening in cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol.* 2013; 10: 274-283.
- 184.** Wang SJ, Sakamoto T, Yasuda Si S, Fukasawa I, Ota Y, Hayashi M, Okura T, Zheng JH, Inaba N. The relationship between telomere length and telomerase activity in gynecologic cancers. *Gynecologic Oncology.* 2002; 84: 81-84.
- 185.** Donaldson P. Reversing the age-dependent decline in lens transport: a new strategy to prevent age related nuclear cataract? *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013; 54: 71-88.
- 186.** West SK, Longstreth JD, Muñoz BE, Pitcher HM, Duncan DD. Model of risk of cortical cataract in the US population with exposure to increased ultraviolet radiation due to stratospheric ozone depletion. *Am J Epidemiol.* 2005; 162: 1080-1088.
- 187.** Prokofyeva E, Wegener A, Zrenner E. Cataract prevalence and prevention in Europe: a literature review. *Acta Ophthalmol.* 2013; 91: 395-405.
- 188.** Delcourt C, Tessier F, Leger CL, Michel F, Papoz L, and the POLA study group. Risk factors for cortical, nuclear, and posterior subcapsular cataracts: the POLA study. *Am J epidemiol.* 2000; 151: 497-504.
- 189.** Ostberg A, Löth A, Gustafson D, Lindblom B. Skövde cataract study: I. Prevalence of lens opacities in a Swedish community. *Ophthalmology.* 2006; 113: 970-975.
- 190.** Zetterberg M, Celojevic D. Gender and cataract - the role of estrogen. *Curr Eye Res.* 2015; 40: 176-190.
- 191.** Eisner A. Sex, eyes, and vision: male/female distinctions in ophthalmic disorders. *Curr Eye Res.* 2015; 40: 96-101.

- 192.** Mukesh BN, Le A, Dimitrov PN, Ahmed S, Taylor HR, McCarty CA. Development of cataract and associated risk factors: the Visual Impairment Project. *Arch Ophthalmol*. 2006; 124: 79-85.
- 193.** Congdon N, West SK, Buhrmann RR, Kouzis A, Muñoz B, Mkocha H. Prevalence of the different types of age-related cataract in an African population. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001; 42: 2478-2482.
- 194.** Noran NH, Salleh N, Zahari M. Relationship between reproductive exposures and age-related cataract in women. *Asia Pac J Public Health*. 2007; 19: 23-28.
- 195.** Worzala K, Hiller R, Sperduto RD, Mutalik K, Murabito JM, Moskowitz M, D'Agostino RB, Wilson PW. Postmenopausal estrogen use, type of menopause, and lens opacities: the Framingham studies. *Arch Intern Med*. 2001; 161: 1448-1454.
- 196.** Zheng Selin J, Rautiainen S, Lindblad BE, Morgenstern R, Wolk A. High-dose supplements of vitamins C and E, low-dose multivitamins, and the risk of age-related cataract: a population-based prospective cohort study of men. *Am J Epidemiol*. 2013; 177: 548-555.
- 197.** Appleby PN, Allen NE, Key TJ. Diet, vegetarianism, and cataract risk. *Am J Clin Nutr*. 2011; 93: 1128-1135.
- 198.** Harding J. The normal lens. En: Harding J editors. *Cataract Biochemistry, Epidemiology and Pharmacology*. London: Chapman and Hall; 1991. p.1-70.
- 199.** Gao J, Wang H, Sun X, Varadaraj K, Li L, White TW, Mathias RT. The effects of age on lens transport. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013; 54: 7174–7187.
- 200.** Christen WG, Glynn RJ, Ajani UA, Schaumberg DA, Buring JE, Hennekens CH, Manson JE. Smoking cessation and risk of age-related cataract in men. *JAMA*. 2000; 284: 713-716.

- 201.** Weintraub JM, Willett WC, Rosner B, Colditz GA, Seddon JM, Hankinson SE. Smoking cessation and risk of cataract extraction among US women and men. *Am J Epidemiol.* 2002; 155: 72-79.
- 202.** Flaye DE, Sullivan KN, Cullinan TR, Silver JH, Whitelocke RA. Cataracts and cigarette smoking. *The City Eye Study. Eye (Lond).* 1989; 3: 379-384.
- 203.** Esteves JF, Dal Pizzol MM, Scococo CA, Roggia MF, Milano SB, Guarienti JA, Rodrigues TC, Canani LH. Cataract and type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 2008; 82: 324-328.
- 204.** Kim SI, Kim SJ. Prevalence and risk factors for cataracts in persons with type 2 diabetes mellitus. *Korean J Ophthalmol.* 2006; 20: 201-204.
- 205.** Klein BEK, Klein R, Lee KE, Danforth LG. Drug use and five-year incidence of age-related cataracts: The Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology.* 2001; 108: 1670-1674.
- 206.** Schaumberg DA, Glynn RJ, Christen WG, Ajani UA, Stürmer T, Hennekens CH. A prospective study of blood pressure and risk of cataract in men. *Ann Epidemiol.* 2001; 11: 104-110.
- 207.** Jiang J, Zhou J, Yao Y, Zhu R, Liang C, Jiang S, Yang M, Lu Y, Xing Q, Guan H. Copy number variations of ADN Repair genes and the Age-related cataract: Jiangsu eye Study. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2013; 54: 932-938.
- 208.** Su S, Yao Y, Zhu R, Liang C, Jiang S, Hu N, Zhou J, Yang M, Xing Q, Guan H. The Associations between Single Nucleotide Polymorphisms of ADN Repair Genes, ADN Damage, and Age-Related Cataract: Jiangsu Eye Study. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2013; 54: 1201-1207.
- 209.** Rodier F, Kim SH, Nijjar T, Yaswen P, Campisi J. Cancer and aging: the importance of telomeres in genome maintenance. *The international journal of biochemistry & cell biology.* 2005; 37: 977-990.

- 210.** Kim SH, Kaminker P, Campisi J. TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. *Nature genetics*. 1999; 23: 405-412.
- 211.** Hsu HL, Gilley D, Galande SA, Hande MP, Allen B, Kim SH, Li GC, Campisi J, Kohwi-Shigematsu T, Chen DJ. Ku acts in a unique way at the mammalian telomere to prevent end joining. *Genes & development*. 2000; 14: 2807-2812.
- 212.** Gonzalo S, Jaco I, Fraga MF, Chen T, Li E, Esteller M, Blasco MA. ADN methyltransferases control telomere length and telomere recombination in mammalian cells. *Nature cell biology*. 2006; 8: 416-424.
- 213.** Blasco MA. The epigenetic regulation of mammalian telomeres. *Nature Reviews*. 2007; 8: 299-309.
- 214.** Franco S, Alsheimer M, Herrera E, Benavente R, Blasco MA. Mammalian meiotic telomeres: composition and ultrastructure in telomerase-deficient mice. *Eur J Cell Biol*. 2002; 81: 335-340.
- 215.** Schoeftner S, Blasco MA. Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by ADN-dependent RNA polymerase II. *Nat Cell Biol*. 2008; 10: 228-236.
- 216.** Donate LE, Blasco MA. Telomeres in cancer and ageing. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2011; 366: 76-84.
- 217.** García-Beccaria M, Martínez P, Flores JM, Blasco MA. In vivo role of checkpoint kinase 2 in signaling telomere dysfunction. *Aging Cell*. 2014; 13: 810-816.



ANEXOS

---





- ✚ ANEXO 1: Consentimiento informado para la inclusión en el estudio.
  
- ✚ ANEXO 2: Resultados por pacientes de la medida de la longitud telomérica y el ensayo de discriminación alélica realizado para los polimorfismos TERT-1327C>T y TERC-63G>A.



## ANEXO 1

---



**HOSPITAL  
UNIVERSITARIO  
D SALAMANCA**

Paseo de San Vicente, 58-182  
37007 Salamanca



Etiqueta del paciente

Se me va a extraer una muestra de sangre para realizar un estudio genético. Se me ha explicado por parte del Dr.....

Y he entendido que:

- 1- El objetivo de dicho estudio es analizar los genes que pueden estar implicados en la patología: Catarata. Del tipo y número de genes que pueden intervenir no se conoce nada en la actualidad, por lo que este estudio debe ser considerado de investigación sin ninguna repercusión práctica a corto plazo.
- 2- La unidad de Medicina Molecular del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca realizará los estudios genéticos y preservará el anonimato de la muestra, guardando confidencialidad sobre la identidad del paciente.
- 3- Los resultados obtenidos podrán ser utilizados para una posible publicación científica, guardando estricta confidencialidad sobre la identidad del paciente.
- 4- Mi ADN sin identificación se podrá utilizar como control en otros estudios genéticos:  
SINO (Táchese lo que no proceda).

He sido informado adecuadamente de los puntos anteriores y de los temas que de ellos derivan por el facultativo Dr.....

En ..... a ..... de ..... 20...

Firma:

DNI nº:



## ANEXO 2

---





ANEXOS

PACIENTE	GRUPO	TELOMEROS	TERT	TERC
25031	2	0,69451705	TT	AG
25240	2	2,78537229	TC	AG
25241	2	1,12420194	TT	AG
25311	2	1,07451539	TT	AG
25312	2	3,01005672	TC	AA
25313	2	4,43829045	TT	AA
25314	2	1,38270574	TC	AG
25352	2	1,51223413	CC	AA
25370	2	0,23296544	CC	AG
25371	2	0,21855199	TC	AG
25453	2	0,2579074	TC	AA
25454	2	1,13066457	TC	AA
25455	2	1,82586183	CC	AA
25458	2	0,26425098	TT	AA
25502	2	3,23159793	TT	AG
25503	2	1,50787608	CC	GG
25504	2	1,39412526	TC	AG
25543	2	1,79384533	CC	AA
25564	2	3,69657204	CC	AG
25601	2	0,83673382	TT	AA
25602	2	4,6748861	TC	AA
25603	2	0,61273004	TT	AA
25688	2	1,75889927	CC	AA
25689	2	4,00547807	TT	AA
25735	2	2,73484059	TC	AA
25764	2	4,32410857	TC	AA
25804	2	2,80385733	TC	AG
25828	2	3,47080494	TC	AA
25845	2	2,89679206	TC	AA
25863	2	1,78446157	TC	AA
25888	2	4,18550602	TC	AG
25914	2	2,87538101	TT	AA
25972	2	2,60834506	TC	AA
26019	2	4,32187009	TT	AG
26423	2	2,48175986	CC	AA
26589	2	0,41663825	CC	AG
26797	2	3,13022731	TT	AA
26839	2	2,49344221	CC	AG
26852	2	2,6101542	TC	AA
26878	2	0,75018912	TC	AA
26916	2	1,53266993	TT	AA
26921	2	1,00294619	TT	AG
26998	2	5,06407907	TC	AA
26999	2	2,92270697	TC	AG

ANEXOS

27001	2	2,94382633	CC	AA
30210	2	7,65641353	TC	AG
13327	3	0,32363978	TC	AA
13328	3	2,3639999	TC	GG
13329	3	2,67997893	CC	AA
13458	3	2,90161337	TC	AA
13459	3	1,02112388	TC	AA
13581	3	2,72513272	TC	AG
13691	3	1,54955343	TC	AG
13798	3	2,54447431	CC	AG
13799	3	2,62815306	TT	AA
13800	3	3,02482977	CC	AG
13801	3	2,80140951	TC	AA
13838	3	2,4345876	TC	AG
13887	3	0	TC	AA
14006	3	2,25466147	TC	AG
14156	3	3,13892163	TT	AA
14370	3	3,85741419	TC	AA
14448	3	2,06463773	TC	AG
14495	3	3,95841957	CC	AG
14716	3	4,27261853	TT	AA
14761	3	3,84463565	TT	AA
14767	3	3,36185836	TT	AA
14918	3	2,56691336	TT	AA
14919	3	4,0185208	TC	AA
14947	3	3,78524145	TT	AA
15116	3	2,90180852	TC	AA
15122	3	3,77773682	TC	AA
15194	3	3,70586851	TC	AG
15206	3	4,07022291	TC	AA
15240	3	3,33603873	TC	AG
15241	3	2,73995426	TT	AA
15242	3	2,14497548	TC	AA
15476	3	3,50647025	TC	AG
15547	3	3,47439179	TT	AG
15548	3	2,46119967	TT	AG
15549	3	5,8711098	TC	AG
15550	3	3,46382673	TT	GG
15599	3	3,61107296	TT	GG
15600	3	3,56723462	TC	AA
15601	3	3,77808939	TC	AG
15602	3	3,23695493	TT	AA
15927	3	2,77719384	TC	AA
15966	3	3,31088218	TC	AA

15968	3	4,89265045	TC	AA
15969	3	3,87636072	TC	AA
15970	3	3,28821688	TC	AA
15971	3	3,25755556	TT	AA
16073	3	2,74363924	TC	AG
16186	3	4,11774205	TC	AG
16188	3	2,54654208	TC	AA
16284	3	4,84335658	CC	AG
16806	3	4,99834231	TC	AA
17119	3	4,60071577	TC	AG
17120	3	5,85610642	CC	AA
17121	3	4,37700153	TT	AA
17122	3	6,03250112	TT	AA
17123	3	3,68790129	TT	AG
30174	0	5,83849669	TT	AA
30175	0	8,80782878	TC	AA
30211	0	7,35149571	TT	AG
30212	0	7,89937817	TT	AA
30236	0	7,08512438	TC	AA
30237	0	6,99948723	TC	AA
30310	0	7,81681602	TC	AG
30311	0	7,58118227	TC	AG
30351	0	7,7686914	TC	AA
30352	0	7,65146554	CC	AA
30399	0	8,14165503	TT	AA
30400	0	7,93794458	TC	AA
30430	0	8,44398454	TC	AA
30495	0	3,56705902	TT	GG
30497	0	1,80488772	TC	GG
30498	0	4,34763208	TC	AA
30499	0	4,42984693	TC	AG
30500	0	4,92940336	TC	AA
30501	0	5,01856124	TC	AA
30514	0	4,03880547	TC	AA
30515	0	5,05854267	TC	AG
30533	0	3,59957349	TT	AA
30618	0	4,29081218	TC	GG
30619	0	5,74315215	CC	AA
30620	0	3,59394111	TC	AA
30717	0	3,32923628	TC	AA
30762	0	4,48042748	TC	AA
30763	0	7,00637795	TT	AA
30810	0	6,13476903	TC	AA
31071	0	6,72906246	TT	AA

ANEXOS

29170	0	3,83321318	TC	AG
30185	0	3,63617345	TC	AA
22537	0	5,91840947	TT	AG
23061	0	5,92733022	TT	AA
23123	0	6,19840422	TC	AG
23145	0	5,86228928	TC	AA
27278	0	5,81016759	TC	AG
25597	0	6,02845205	CC	AA
25740	0	6,01339216	TT	AG
26195	0	5,71509661	TC	AA
27171	0	5,91800584	TC	AG
27697	0	6,37929061	TC	AA
27301	0	5,67560157	TC	AA
27329	0	6,49451521	TC	AA
27330	0	5,65322712	CC	AA
27230	0	6,45042972	TC	AA
26590	0	1,3489693	TT	AA
13797	1	6,26514073	TC	AG
13837	1	6,04603732	TT	AA
14064	1	6,2945987	TC	AA
14065	1	3,25228074	TT	AA
14157	1	6,72290694	TT	AA
14444	1	5,18127144	TT	AA
14715	1	5,65778637	TC	AA
14758	1	4,1344433	CC	AG
14759	1	4,0105322	CC	AA
14916	1	3,92896897	TC	AA
14917	1	5,04105065	CC	AG
14949	1	2,16393592	CC	AG
14984	1	4,19373828	CC	AA
14985	1	4,56190688	TC	AA
14986	1	2,58717619	CC	AA
15238	1	5,5114405	CC	AG
15123	1	4,39887582	TC	AG
15124	1	4,32727433	TT	AA
15125	1	4,70551819	TC	AA
15159	1	4,57755538	TC	AA
15252	1	2,62414785	TC	AG
15253	1	2,77189159	TC	GG
15630	1	3,88237334	CC	AA
15631	1	4,25833244	CC	AG
15632	1	4,19966459	CC	AA
15376	1	2,98985466	TC	AA
15823	1	4,38658727	TC	AG

15848	1	3,33506318	TT	AA
16276	1	3,64623396	CC	AA
16342	1	3,64625339	TC	AG
16343	1	3,69401992	TC	AA
16498	1	4,69430661	TC	AG
16392	1	2,32922546	TC	AA
16407	1	3,3644662	TT	AG
15545	1	3,50430951	TC	AA
16499	1	6,2797001	TT	AG
16531	1	3,88183472	TC	AA
16586	1	3,68548522	CC	AA
16587	1	5,51971306	TT	AG
16588	1	3,64869897	TT	AA
16902	1	4,71578257	CC	AA
16936	1	4,2890529	TT	AG
16937	1	3,63134404	TT	GG
30226	1	5,76586292	TC	AG
30371	1	5,08156987	TC	AA
30396	1	7,06102803	CC	AA
30397	1	5,86236303	TT	AA
30398	1	6,24009016	TC	AA
30431	1	5,49583849	TC	AA
30469	1	6,41079147	TT	AA
30492	1	5,84962678	TC	AG
30530	1	5,78873479	TC	AA
30531	1	6,36219803	TC	AA
30556	1	6,7627434	TC	AA
30551	1	7,2040085	TC	AG
30758	1	6,06399993	CC	AA

GRUPO: 0= controles menor de 55 años; 1 = controles mayor de 60 años; 2=casos menor de 55 años; 3=casos mayor de 60 años.

